

PRACA DOKTORSKA

K-g - -

*Monika Asztemborska*

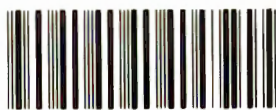
*Supramolekularne kompleksowanie monoterenoidów przez  
cyklodekstryny - wykorzystanie w chromatografii gazowej*

*Praca doktorska*

*H. N. K. K.*

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

**F-B.328/1998**



**80000000002659**

*Promotor:*

*Profesor Danuta Sybilska*

*Polska Akademia Nauk*

*Instytut Chemii Fizycznej*

*Warszawa 1998*



B 328/58

## *Podziękowania*

*Pani profesor Danucie Sybilskiej*

*za pomoc i opiekę oraz udzielenie wielu cennych rad i wskazówek podczas wykonywania i opisywania niniejszej pracy.*

*Pani dr hab. Renacie Ochockiej*

*za współpracę i ciekawą tematykę badań.*

*Wszystkim koleżankom i kolegom z zakładu II*

*za stworzenie życzliwej i sympatycznej atmosfery w pracy.*

## *Spis Treści*

Wstęp	5
Część Literaturowa	7
1. Terpenoidy	8
1.1. Budowa i występowanie terpenoidów	8
1.2. Klasyfikacja i nomenklatura terpenoidów	9
1.3. Rola i zastosowanie monoterpenuoidów	10
1.4. Biosynteza związków terpenowych	11
1.5. Izomeria związków terpenowych	12
1.5.1. Klasyfikacja izomerów	13
1.5.2. Izomery konstytucyjne	14
1.5.3. Enancjomery	15
1.5.4. Enancjomery związków terpenowych	16
1.5.5. Diastereoizomery terpenów	18
1.6. Analiza związków terpenowych	19
2. Podstawowe pojęcia chromatografii	21
2.1. Chromatografia gazowa	21
2.2. Parametry retencji	22
2.3. Parametry związane z kolumną chromatograficzną	24
2.4. Analiza jakościowa	28
2.4.1. Identyfikacja za pomocą parametrów retencji	29
2.4.2. Identyfikacja za pomocą sprzężenia chromatografii z innymi metodami analitycznymi	30

2.5. Analiza ilościowa	31
<b>3. Cyklodekstryny - budowa i zastosowanie</b>	<b>33</b>
3.1. Otrzymywanie cyklodekstryn	33
3.2. Budowa cyklodekstryn	34
3.3. Właściwości cyklodekstryn	36
3.4. Kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn	36
3.5. Pochodne cyklodekstryn	38
3.6. Zastosowanie cyklodekstryn	39
3.7. Zastosowanie cyklodekstryn w chromatografii gazowej	40
3.7.1. Krystaliczne cyklodekstryny i ich pochodne	42
3.7.2. Polimery cyklodekstryn	42
3.7.3. Pochodne cyklodekstryn	43
3.7.4. Roztwory naturalnych cyklodekstryn	44
<b>Część Doświadczalna</b>	<b>47</b>
<b>4. Część eksperymentalna</b>	<b>48</b>
4.1. Aparatura	48
4.2. Kolumny, wypełnienia i postępowanie	48
4.3. Odczynniki	49
4.4. Substancje badane	49
<b>5. Badania wstępne</b>	<b>51</b>
<b>6. Teoretyczny opis systemów z cyklodekstrydami</b>	<b>55</b>
<b>7. Wpływ cyklodekstryn na chromatograficzne zachowanie się monoterpenów</b>	<b>59</b>

7.1. Wpływ rodzaju cyklodekstryny na kolejność elucji monoterpenu	59
7.2. Wpływ stężenia naturalnych cyklodekstryn na podstawowe parametry chromatograficzne	64
7.2.1. Wpływ stężenia $\beta$ - i $\gamma$ -cyklodekstryny na chromatograficzne zachowanie się monoterpenu	65
7.2.2. Wpływ stężenia $\alpha$ -cyklodekstryny na chromatograficzne zachowanie się terpenów	66
7.3. Szacowanie stałych trwałości kompleksów monoterpenu z cyklodekstrynami	69
7.3.1. Szacowanie stałych trwałości kompleksów monoterpenu z $\beta$ - i $\gamma$ -cyklodekstryną	69
7.3.2. Szacowanie stałych trwałości kompleksów monoterpenu z $\alpha$ -cyklodekstryną	71
8. Rola matrycy jako rozpuszczalnika naturalnych cyklodekstryn w przygotowaniu stereoselektywnych faz stacjonarnych	74
8.1. Porównanie chromatograficznych właściwości $\alpha$ -, $\beta$ - i $\gamma$ -cyklodekstryn rozpuszczonych w glicerynie i w formamidzie.	76
8.2. Przykłady nowych rozdzieleń w glicerynowych roztworach cyklodekstryn	79
8.2.1. Rozdzielenia diastereoizomerów	79
8.2.2. Rozdzielenia enancjomerów	82
8.2.3. Wpływ stężenia $\alpha$ -cyklodekstryny na rozdzielenie enancjomerów monoterpenu	83
9. Układy imitujące chromatografię wielowymiarową	86
9.1. Weryfikacja eksperymentalna metody	91
10. Praktyczne zastosowanie faz stacjonarnych zawierających cyklodekstryny	93
10.1. Chromatograficzna analiza czystości enancjomerycznej komercyjnych próbek kamfenu	93
10.2. Analiza składu enancjomerycznego leków zawierających w swoim składzie związki terpenowe	97

10.2.1. Ocena poprawności metody analitycznej _____	99
10.3. Skład enancjomeryczny węglowodorów monoterpenowych w olejkach eterycznych z jałowca pospolitego ( <i>Juniperus communis</i> L.) _____	103
11. Dyskusja i wnioski _____	110
Streszczenie _____	117
Literatura _____	119



## WSTĘP

Monoterpeny, należące do większej grupy terpenów są związkami wszechobecnymi w świecie roślinnym. Rola jaką związki te pełnią w przyrodzie nie jest wciąż dostatecznie wyjaśniona. Są one za to szeroko wykorzystywane przez człowieka w praktyce jako substancje zapachowe w przemyśle kosmetycznym i perfumeryjnym, jako aromaty i substancje smakowe w przemyśle spożywczym i produkcji napojów alkoholowych oraz jako środki farmakologiczne w przemyśle farmaceutycznym.

W grupie węglowodorów monoterpenowych o ogólnym wzorze sumarycznym  $C_{10}H_{16}$ , które są głównym obiektem badań niniejszej pracy występuje wiele izomerów różnego typu; można tu wymienić izomery konstytucyjne, diastereomery i enancjomery. Tak ze względu na dużą liczbę izomerów jak i brak czystych wzorców, mieszaniny monoterpenów izolowane z materiału roślinnego stanowią skomplikowany przedmiot badań analitycznych. Trudności są powielane po pierwsze przez fakt, że w przypadku naturalnych mieszanin monoterpenów w zasadzie nie mamy nigdy do czynienia z racematami lub związkami homochiralnymi, po drugie olejki eteryczne z tego samego gatunku rośliny mogą różnić się znacznie składem izomerycznym. Przyczyny tego zjawiska nie zostały dotychczas wyjaśnione głównie z powodu braku odpowiednich metod analitycznych. Rozwiązanie tych problemów ma ogromne znaczenie poznawcze i praktyczne. Wiadomo bowiem, że izomery chociaż podobne pod względem budowy mogą różnić się znacznie aktywnością biologiczną a co za tym idzie oddziaływaniem na organizm człowieka. Dotyczy to zwłaszcza związków optycznie czynnych dla których rozdział chromatograficzny do dzisiaj jest skomplikowanym problemem. Z tego punktu widzenia konieczne wydawało się opracowanie stosunkowo prostych i

możliwie dostępnych metod analitycznych które umożliwiłyby kontrolę składu i czystości optycznej mieszanin związków tej klasy.

*Głównym celem przedstawionej pracy było zaprojektowanie założeń i zbadanie fizykochemicznych podstaw do optymalizacji metod supramolekularnej chromatografii, przeznaczonych do analizy mniej lub bardziej złożonych mieszanin izomerycznych węglowodorów terpenowych oraz ich tlenowych pochodnych.*

Do realizacji tego celu wybrano metodę chromatografii gazowej z zastosowaniem cyklodekstryn. Chromatografia gazowa może być bowiem traktowana jako metoda z wyboru do analizy lotnych mieszanin terpenów, cyklodekstryny zaś jako środek z wyboru do rozdzielania izomerów w tym także enancjomerów ponieważ o trwałości kompleksów z cyklodekstrynami decyduje głównie kształt cząsteczki gościa. Dzięki dużej zdolności tworzenia kompleksów inkluzyjnych z różnego rodzaju cząsteczkami oraz dzięki temu, że same są związkami chiralnymi, cyklodekstryny stały się w ostatnich latach najbardziej uniwersalnym narzędziem do rozdzielania izomerów w tym również enancjomerów.

# CZĘŚĆ LITERATUROWA

## Wprowadzenie do opracowania literaturowego

Praca dotyczy zastosowania cyklodekstrynowych środowisk supramolekularnych do optymalizacji chromatograficznych metod rozdzielania izomerycznych mieszanin lotnych terpenów.

W związku z zakresem pracy opracowanie literaturowe składa się z trzech podstawowych części:

- ⇒ rozdział pierwszy poświęcony jest obiektowi badań - związkom terpenowym - ich występowaniu, budowie i właściwościom oraz obecnemu postępowi w analizowaniu tych substancji,
- ⇒ rozdział drugi zawiera podstawowe wiadomości o chromatografii gazowej, głównej metodzie badawczej zastosowanej w niniejszej pracy,
- ⇒ w rozdziale trzecim omówione są właściwości cyklodekstryn służących do selekcji izomerów oraz przegląd ich dotychczasowych zastosowań w chromatografii gazowej.

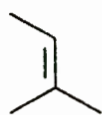
## 1. Terpenoidy

### 1.1. Budowa i występowanie terpenoidów

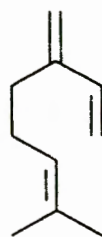
Terpenoidy są produktami naturalnymi występującymi w roślinach, odznaczającymi się złożoną i różnorodną strukturą cząsteczkową. Z pozoru wiele z tych struktur wydaje się być dziwacznych i niepodobnych do siebie. Istnieje jednak dostrzegalny szkielet dzięki któremu stanowią one jedną dużą grupę związków. Stąd wywodzi się sugestia, że wszystkie terpenoidy występujące w roślinach powstają z tego samego źródła i tą samą drogą.

Wiadomo również, że kwiaty, owoce, liście i korzenie wielu roślin zawierają lotne substancje zapachowe nazywane olejkami eterycznymi. Zainteresowanie składem chemicznym olejków eterycznych rozszerzyło się w XIX w., gdy stwierdzono, że są to skomplikowane mieszaniny zawierające związki acykliczne, alicykliczne, aromatyczne i heterocykliczne. Okazało się, że wiele olejków zawiera jedną lub więcej serii izomerycznych węglowodorów o ogólnym wzorze  $C_{10}H_{16}$ . Związki te nazwano terpenami ze względu na ich skojarzenie z olejkami terpentynowym. Wraz z odkrywaniem w olejkach coraz większej liczby związków o szerokiej gamie grup funkcyjnych np. alkohole, ketony, aldehydy - końcówka eny w wyrazie terpeny - sugerująca węglowodory stała się nieadekwatna. Zaistniała tendencja do zastąpienia jej nazwą bardziej ogólną - terpenoidy - analogicznie do steroidów.

Badania strukturalne terpenoidów  $C_{10}H_{16}$  wykazały, że formalnie są to dimery izoprenu. Jednostki izoprenowe połączone są wiązaniem głowa do ogona. Prostym przykładem może być myrcen - węglowodór acykliczny składający się z dwóch jednostek izoprenowych.



izopren



myrcen

Podczas badania wyżej wrzących frakcji olejków eterycznych zostały odkryte związki zawierające 15 atomów węgla - zbudowane z trzech jednostek izoprenowych. Fakty te doprowadziły do sformułowania uogólnienia zwanego "Zasadą Izoprenową" zasugerowaną przez Wallacha w 1887 r., później rozwiniętą przez Robinsona, że związki terpenoidowe muszą mieć szkielet węglowy złożony z jednostek izoprenowych połączonych wiązaniem głowa do ogona. Zasada izoprenowa jest prawdziwa dla większości terpenoidów dotąd odkrytych. Sam izopren jest produktem pirolizy wielu węglowodorów terpenowych np. limonenu lub naturalnych gum. W odpowiednich warunkach izopren dimeryzuje do ( $\pm$ )-limonenu. W warunkach naturalnych wykryto, że izopren jest emitowany przez roślinność lasów m.in. przez drzewa liściaste, przy czym ilość wydzielanego izoprenu jest proporcjonalna do intensywności promieniowania słonecznego i temperatury liści. Izopren jest istotnym składnikiem atmosfery w lasach tropikalnych [1].

## 1.2. Klasyfikacja i nomenklatura terpenoidów

Terpenoidy zostały sklasyfikowane według liczby jednostek izoprenoidowych.

Klasa	Liczba atomów węgla
Monoterpenoidy	10
Seskwiterpenoidy	15
Diterpenoidy	20
Sesterpenoidy	25
Triterpenoidy	30
Tetraterpenoidy	40
Politerpenoidy	>40

Nomenklatura terpenoidów jest raczej niezadowolająca. Systematyczne nazwy są dla większości związków niepraktyczne i większość naturalnie występujących substancji ma swoje własne proste nazwy zwyczajowe, zazwyczaj bazujące na ich pochodzeniu botanicznym np.  $\alpha$ -pinen - główny składnik olejku eterycznego z sosny (łac. *Pinus*), sabinen - główny składnik olejku z jałowca sawina (łac. *Juniperus sabina*).

### 1.3. Rola i zastosowanie monoterpenoidów

Ze względu na ograniczenia jakie nakłada metoda chromatografii gazowej i używane chiralne fazy stacjonarne, obiektem badań niniejszej pracy jest jedynie pierwsza grupa tych interesujących związków - monoterpenoidy; dlatego one zostaną tu szerzej omówione.

Funkcja monoterpenoidów w przyrodzie nie jest wciąż dostatecznie wyjaśniona.

Istnieje kilka hipotez na ten temat. Mogą one pełnić rolę atraktantów zapylania, konkurentów fitotoksyczności, obrony przeciw trawozernym, insektom, fitofagom i

patogenom mikrobiologicznym. Sugeruje to generalnie ekologiczną funkcję dla związków tej klasy [2, 3].

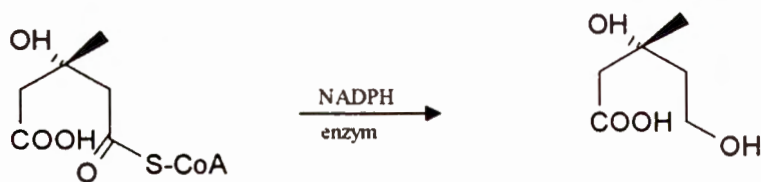
Skład ilościowy i jakościowy monoterpenów w roślinie jest kontrolowany przez stosunkowo proste systemy genetyczne. Monoterpeny są szeroko stosowane jako biochemiczne wskaźniki w genetyce roślin leśnych (szpilkowych), mają również zastosowanie w badaniach taksonomicznych. Zróznicowanie w składzie monoterpenów umożliwia identyfikację klonów, hybryd, pokrewieństwa lub badania struktury populacji tych roślin [4, 5, 6].

Lotne związki terpenowe odgrywają ważną rolę jako naturalne substancje zapachowe i służą jako modele do chemicznej syntezy substancji "identycznych z naturalnymi". Są wykorzystywane w farmacji, weterynarii, ziołolecznictwie, przemyśle perfumeryjnym i spożywczym.

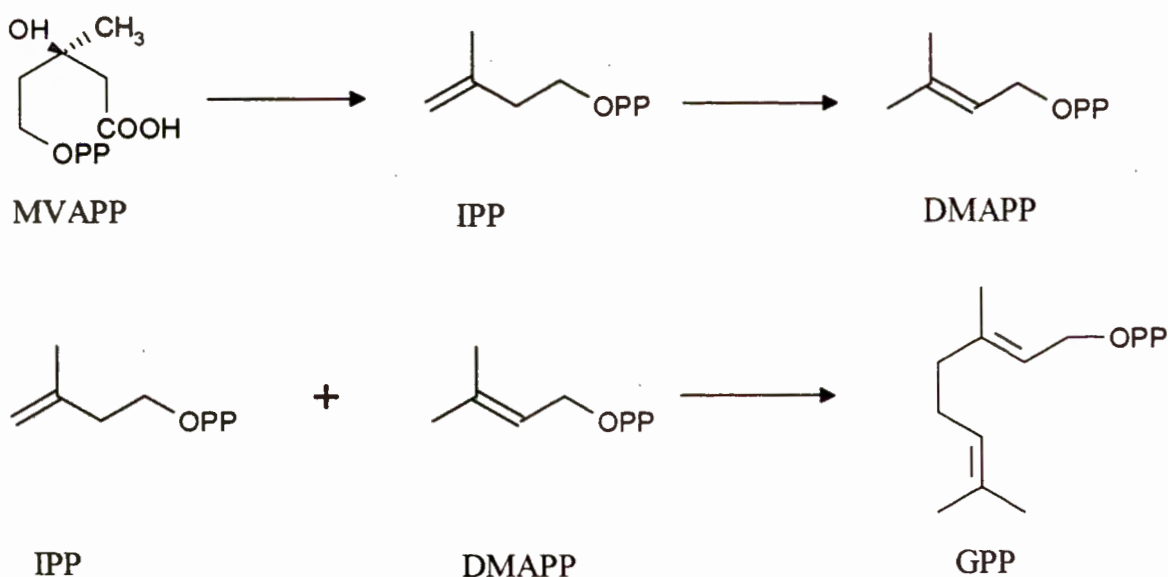
#### **1.4. Biosynteza związków terpenowych**

Tworzenie znaczących ilości monoterpenoidów (>0,1% świeżej masy tkankowej) jest ograniczone do ok. 50 rodzin roślin wyższych. Są one syntetyzowane w komórce roślinnej w specyficznych niezielonych plastydach - leukoplastach, a następnie gromadzone w różnego typu wysoko wyspecjalizowanych strukturach wydzielniczych takich jak włoski wydzielnicze i przewody żywicowe. Biosynteza monoterpenoidów *in vivo* może przebiegać jedynie w obecności światła w przeciwieństwie do seskwiterpenoidów, które mogą być syntezowane również w ciemności [7].

Prekursorem w syntezie związków terpenowych jest kwas (R)-mewalonowy, który powstaje poprzez nieodwracalną redukcję S-3-hydroksy-3-metyloglutaryl koenzymu A przy pomocy zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) i w obecności enzymu [8]:



W pierwszym etapie przekształceń następuje dekarboksylacja pirofosforanu kwasu mewalonowego (MVAPP), połączona z eliminacją podstawnika hydroksylowego na atomie C-3. Dalszy etap stanowi izomeryzacja pięciowęglowego szkieletu węglowodorowego pirofosforanu izopentenylu (IPP) do pirofosforanu dimetyloallilu (DMAPP), po czym następuje kondensacja obu pięciowęglowych fragmentów do pirofosforanu geranylu (GPP):



Pirofosforan geranylu jest bezpośrednim prekursorem w biosyntezie monoterenoidów.

### 1.5. Izomeria związków terpenowych

Ogólna klasyfikacja izomerów ze względu na ich dużą różnorodność pozostaje wciąż trudnym do rozwiązania problemem. Do klasyfikacji izomerów związków chiralnych najczęściej stosuje się konwencję Cahna, Ingolda i Preloga [9]. Interesującą



klasyfikację izomerów cząsteczek organicznych możemy znaleźć w pracy Dodziuk [10].

### 1.5.1. Klasyfikacja izomerów

Związki o tym samym wzorze sumarycznym, lecz różnej budowie i zwykle różnych właściwościach fizycznych i chemicznych nazywamy izomerami.

Izomery możemy podzielić na:

1. Izomery konstytucyjne - różniące się sposobem i kolejnością wiązania atomów, w tym:
  - a) łańcuchowe - różniące się układem wiązań w łańcuchu
  - b) pierścieniowe - różniące się układem wiązań w pierścieniu
  - c) funkcyjne - mające różne grupy funkcyjne
  - d) pozycyjne - różniące się rozmieszczeniem grup funkcyjnych w szkielecie
2. Stereoizomery lub izomery przestrzenne - różniące się przestrzennym rozmieszczeniem atomów i układu wiązań, w tym:
  - a) enancjomery
  - b) diastereoizomery

Cząsteczki enancjomerów są względem siebie odbiciami lustrzanymi, których nie można na siebie nałożyć, natomiast ich wymiary, kształt i odległości międzyatomowe są identyczne. Zostały one nazwane związkami chiralnymi - od greckiego słowa  $\chiειροσ$  - ręka, gdyż relacja w jakiej pozostają do siebie enancjomery chiralnego układu przypomina relację pomiędzy prawą i lewą ręką. W środowisku achiralnym wszystkie właściwości fizykochemiczne enancjomerów są takie same.

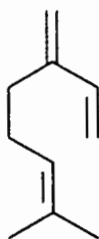
Pozostałe stereoizomery, czyli takie, które nie są względem siebie odbiciami lustrzanymi, to diastereoizomery. W odróżnieniu od enancjomerów, diastereoizomery

różnią się między sobą energią potencjalną cząsteczek, momentami dipolowymi, temperaturami topnienia i wrzenia oraz współczynnikami załamania światła.

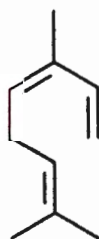
### 1.5.2. Izomery konstytucyjne

Wśród naturalnie występujących terpenoidów możemy znaleźć niemalże wszystkie typy izomerów. Spośród izomerów konstytucyjnych występują tu:

- związki łańcuchowe np.:

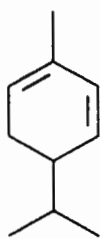
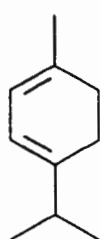
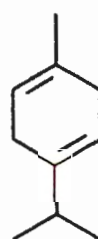


myrcen

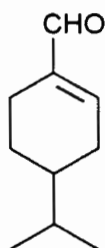


ocymen

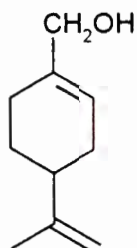
-związki pierścieniowe np.:

 $\alpha$ -felandren $\alpha$ -terpinen $\gamma$ -terpinen

-związki zawierające różne grupy funkcyjne np.:

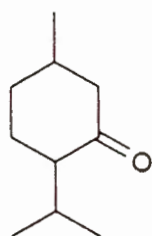


felandral

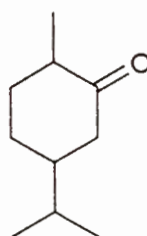


alkohol peryllowy

-izomery pozycyjne np.:



menton



karwomenton

### 1.5.3. Enancjomery

Pochodzenie chiralności w cząsteczkach organicznych tworzących żywą materię wciąż pozostaje niewyjaśnione. Istnieje co prawda wiele hipotez na ten temat, żadna z nich jednak nie jest na tyle udokumentowana, żeby była możliwa do powszechnego przyjęcia.

Białka - podstawowy budulec żywych organizmów są biopolimerem składającym się z chiralnych aminokwasów. Podobnie kwasy nukleinowe: RNA - uczestniczący w biosyntezie białek i DNA - nośnik informacji genetycznej są polimerami, których podjednostki - nukleotydy zawierają chiralne cukry - rybozę i deoksyrybozę.

Monomery tych istotnych dla życia biopolimerów są całkowicie homochiralne tzn. zawierają tylko jeden z dwóch możliwych enancjomerów, aminokwasy posiadają konfigurację L, cukry natomiast konfigurację D.

Konsekwencje chiralności są bardzo istotne dla człowieka i wszystkich żywych organizmów. Ponieważ nasze receptory są zbudowane z chiralnych białek, reagują one inaczej z dwoma enancjomerami tej samej substancji, które w braku czynnika chiralnego są identyczne z fizykochemicznego punktu widzenia. Znanych jest wiele przypadków zwłaszcza z dziedziny farmacji, gdzie jeden z enancjomerów chiralnej

substancji ma działanie farmakologiczne drugi natomiast w najlepszym razie może być nieaktywny; może mieć zupełnie inne działanie, czasami okazywał się szkodliwy. Np.:

⇒ Talidomid - enancjomer R jest środkiem uspokajającym natomiast enancjomer S ma działanie teratogenne,

⇒ Penicillamina - enancjomer D jest środkiem antyartretycznym a enancjomer L jest silnie toksyczny,

⇒ Verapamil - enancjomer S obniża ciśnienie krwi, enancjomer R natomiast hamuje odporność komórek rakowych na leki antyrakowe.

Dwa enancjomery tej samej substancji mogą również wywoływać zupełnie różne wrażenia węchowe. Można przytoczyć wiele przykładów z grupy omawianych tu związków terpenowych:

- ☛ (+)-karwon - ma zapach kminkowy a (-)-karwon pachnie miętowo,
- ☛ (+)- $\alpha$ -terpineol ma zapach miły, kwiatowy, przypominający bez, (-)- $\alpha$ -terpineol ma zapach terpentynowy, żywiczny,
- ☛ (+)-limonen ma zapach cytrusowy podobny do pomarańczy a (-)-limonen ma zapach niemiły, terpentynowy.

#### ***1.5.4. Enancjomery związków terpenowych***

Żywe komórki cechuje duża jednorodność konfiguracyjna chiralnych składników białek i kwasów nukleinowych. Konsekwencją tego jest jednorodność konfiguracyjna metabolitów podstawowych. W obrębie chiralnych metabolitów wtórnych - którymi są m.in. monoterpenoidy tak duża jednorodność już nie występuje. W świecie roślin, różne gatunki mogą wytwarzać dany związek terpenowy zarówno w formie (+) jak i (-), np. (+)-limonen jest charakterystyczny dla olejków eterycznych z rodziny

*Rutaceae* (pomarańczowy, cytrynowy, mandarynkowy) [11], natomiast (-)-limonen występuje w olejkach drzew z rodziny *Pinaceae* (sosnowy, jodłowy) [12, 13], (+)-menton i (-)-izomenton są składnikami olejków z różnych odmian mięty a ich optyczne antypody - (-)-menton i (+)-izomenton występują w olejkach z geranium [14].

Ten sam gatunek rośliny może produkować enancjomery danego związku w różnych proporcjach np.  $\alpha$ -pinen występujący w dużych ilościach w olejkach sosnowym i jałowcowym w zależności od osobnika może występować w przeważającej ilości w formie (+) albo też jako (-) [12, 13, 15, 16].

Monoterpeny często służą jako wyjściowy materiał do stereoselektywnej syntezy m.in. feromonów różnych owadów. W przypadku feromonów - atraktantów insektów obserwuje się skomplikowane zależności pomiędzy jego aktywnością a składem enancjomerycznym. Niektóre owady reagują tylko na jeden enancjomer, inne reagują jednakowo na oba enancjomery albo na specyficzne proporcje obu enancjomerów.

Czasami nieaktywny enancjomer blokuje swój aktywny antypod.

Np. alkohol terpenowy (-)-terpinen-4-ol o czystości enancjomerycznej >99% jest feromonem kornika (*Polygraphus poligraphus*), natomiast racemiczny terpinen-4-ol nie posiada właściwości wabiących dla tych owadów [17]. Różne gatunki termitów produkują wydzieliny obronne o określonym składzie enancjomerycznym (+/-) $\alpha$ -pinenu i (+/-)limonenu [18].

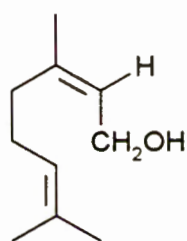
Kannabinoidy - związki chiralne, które naturalnie występują w konopiach indyjskich początkowo były uważane za stosunkowo mało stereospecyficzne w testach na aktywność psychotropową. Jednak po dokładnym przygotowaniu enancjomerycznie czystych związków okazało się, że enancjomer o konfiguracji 3R,4R jest jednym z najsilniejszych związków psychotropowych w tej grupie, a enancjomer 3S4S jest pozbawiony tej aktywności, ma natomiast słabe właściwości przeciwbólowe i



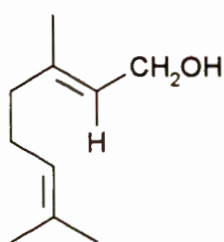
przeciwwymiotne. Wcześniejsze doniesienia o słabych właściwościach psychotropowych konfiguracji 3S4S wzięły się prawdopodobnie z zanieczyszczenia małymi ilościami enancjomerem 3R4R. Było to spowodowane użyciem do syntezy  $\alpha$ -pinenu, którego czystość enancjomeryczna wynosiła tylko 95-98% [19].

### 1.5.5. Diastereoizomery terpenów

Spośród diastereoizomerów związków terpenowych najlepszym przykładem są *cis-trans* acykliczne alkohole monoterpene - geraniol i nerol oraz odpowiadające im aldehydy geranial i neral.

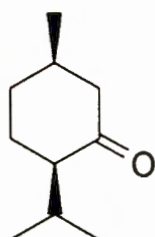
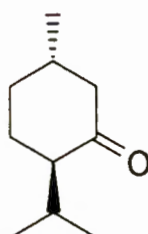


Nerol (cis)



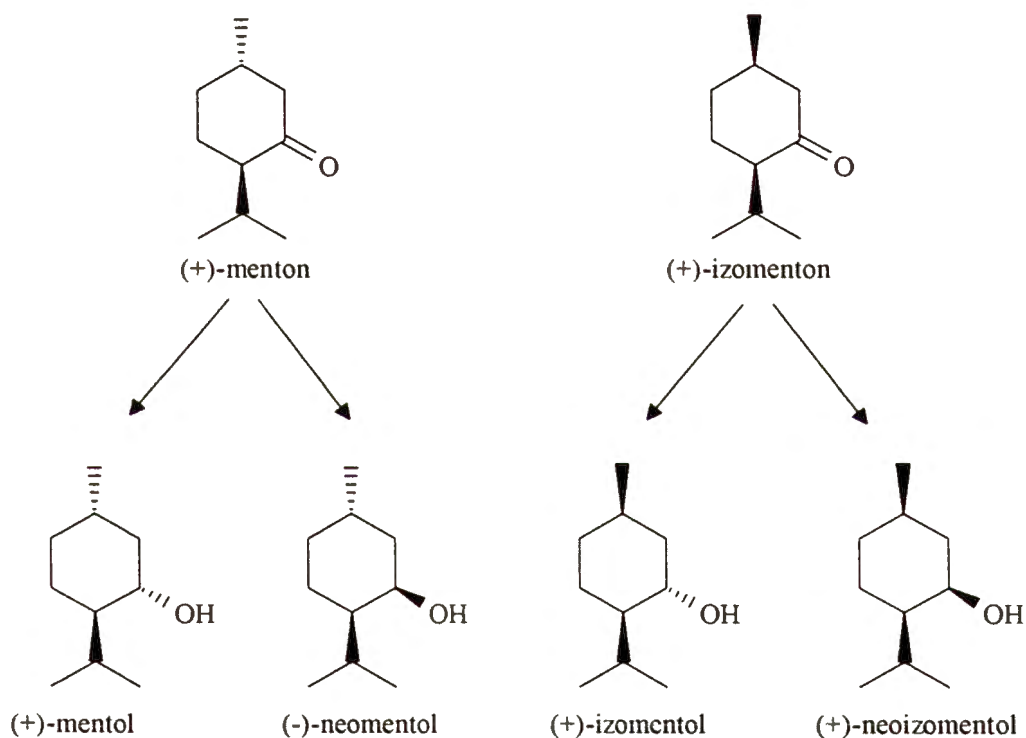
Geraniol (trans)

Ciekawym przykładem jest też menton i mentol. Związkiem podstawowym jest 1,4-dwupodstawiony cykloheksan, który może występować w formie *cis*- i *trans*-.

cis-menton  
(izomenton)trans-menton  
(menton)

Te dwie diastereomeryczne formy mentonu znane jako menton i izomenton mogą występować w dwóch optycznie aktywnych formach (+) i (-).

Kiedy menton jest zredukowany do drugorzędowego alkoholu - mentolu pojawia się nowe centrum asymetrii i mentol o trzech asymetrycznych atomach węgla może występować w ośmiu optycznie aktywnych formach. Wszystkie te formy są znane i tak z mentonu otrzymano po dwa enancjomery mentolu i neomentolu natomiast z izomentonu otrzymano odpowiednio izomentol i neoizomentol [20]. W rezultacie wśród grupy ośmiu stereoizomerów mentolu występują cztery diastereomeryczne pary enancjomerów.



### 1.6. Analiza związków terpenowych

W analizie związków terpenowych pochodzących z roślinnych olejków eterycznych jak również z innych naturalnych źródeł, metodą z wyboru jest chromatografia gazowa.

Technika ta jest najbardziej użyteczna w tego rodzaju analizach ponieważ badane związki są lotne jak również ze względu na wysoką rozdzielczość i szybkość analiz,

co jest niebagatelną zaletą w przypadku badania składu tych skomplikowanych mieszanin.

Obecnie najczęściej stosuje się wysokorozdzielczą kapilarną chromatografię gazową oraz chromatografię gazową połączoną ze spektrometrią masową, która daje możliwości bezpośredniej identyfikacji rozdzielanych terpenów.

Ponieważ w grupie monoterpenów występuje duża liczba izomerów, a w tym enancjomerów do których rozdzielania nie wystarczy zastosowanie nawet najbardziej sprawnej kolumny kapilarnej z klasyczną fazą stacjonarną, konieczna była modyfikacja tej metody. Modyfikatorem tym stały się cyklodekstryny, dzięki swojej zdolności tworzenia kompleksów o których trwałości decyduje przede wszystkim kształt cząsteczki gościa oraz dzięki temu, że zbudowane z chiralnej (+)-D-glukozy tworzą homochiralne środowisko umożliwiające rozdzielanie enancjomerów.

Pierwsze opublikowane badania bezpośredniego rozdzielania enancjomerów związków terpenowych w niektórych olejkach eterycznych zaczęły się pojawiać na początku lat 90-tych [21, 22, 23]. Było to związane z opracowaniem metod analitycznych odpowiednich do rozdzielania tych substancji chiralnych. Autorzy prac w zakresie tej tematyki ze względu na złożoność analizy ograniczali się do rozdzielania pojedynczych chiralnych składników olejków [24, 25, 26]. Wiedza na ten temat jest jednak wciąż niepełna i bardzo fragmentaryczna.



## 2. Podstawowe pojęcia chromatografii

Chromatografia obejmuje różne techniki których podstawą jest proces podziału składników rozdzielanej mieszaniny pomiędzy dwie nie mieszające się ze sobą fazy.

Przez fazę stacjonarną o dużej powierzchni przepływa w jednym kierunku faza ruchoma. W chromatografii kolumnowej rozdzielana mieszanina jest wprowadzana do fazy ruchomej która transportuje ją do kolumny gdzie następuje kontakt próbki z fazą stacjonarną. Mieszanina przesuwana jest przez kolumnę gdzie dzięki różnicy w oddziaływaniu poszczególnych jej składników z fazą stacjonarną następuje jej rozdzielanie. Oddziaływania międzycząsteczkowe sprawiają, że rozdzielane substancje są w różnym stopniu zatrzymywane przez fazę stacjonarną.

Do niedawna można było wymienić trzy główne techniki chromatograficzne:

kolumnową chromatografię cieczową, kolumnową chromatografię gazową oraz chromatografię cienkowarstwową (wcześniej bibułową). Podstawą do rozróżniania rodzajów chromatografii był typ prostych oddziaływań badanych cząsteczek z układem; w tym najważniejsze to adsorpcja, wymiana jonowa, podział. W ciągu ostatnich kilkunastu lat sprawa stała się bardziej skomplikowana. Zostały wprowadzone nowe rodzaje i techniki np. wysokosprawna chromatografia cieczowa, nowe często bardziej złożone techniki chromatografii np. chromatografia fluidalna oraz wiele technik pokrewnych np. elektroforeza kapilarna.

### 2.1. Chromatografia gazowa

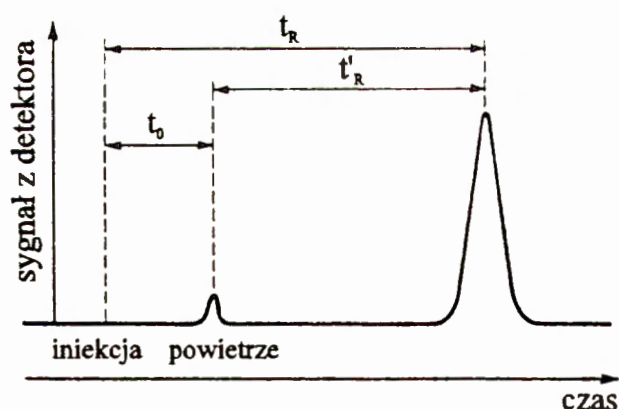
Ze względu na to, że w pracy doświadczalnej wykorzystywano głównie metodę chromatografii gazowej, szerzej omówiona zostanie tylko ta metoda chromatograficzna.

Chromatografia gazowa obejmuje wszystkie metody chromatograficzne w których fazą ruchomą jest gaz. Fazą stacjonarną jest albo substancja stała - mówimy wtedy o chromatografii gazowej adsorpcyjnej albo ciecz o dużej lepkości naniesiona na nośnik lub ścianę kolumny - mamy wtedy do czynienia z chromatografią podziałową.

Obecnie chromatografia gazowa jest bardzo dobrze rozwiniętą techniką analityczną, mającą bogate piśmiennictwo. Wydano wiele prac monograficznych z tego zakresu [27-29], dostępne są również monografie w języku polskim [30, 31].

## 2.2. Parametry retencji

Pozycję piku chromatograficznego opisuje się przez podanie *czasu retencji* -  $t_R$ . Pod tym pojęciem rozumiemy czas który upłynął od momentu wstrzyknięcia próbki do osiągnięcia maksymalnego stężenia eluowanego składnika w detektorze. *Objętość retencji*  $V_R$  jest równa iloczynowi objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej i czasu retencji.



Rys. 2.1 Schematyczne przedstawienie całkowitego czasu retencji  $t_R$ , zerowego czasu retencji  $t_0$  i zredukowanego czasu retencji  $t'_R$  [30]

Zerowy czas retencji -  $t_0$ , jest to czas retencji substancji która nie oddziałuje zupełnie z fazą stacjonarną. Zerowy czas retencji czyli czas przebywania składnika w fazie gazowej nie jest cechą charakterystyczną substancji i dlatego musi być odjęty od całkowitego czasu retencji - w ten sposób otrzymujemy *zredukowany czas retencji*  $t_R'$ . Iloczyn zerowego czasu retencji przez objętościową prędkość przepływu fazy ruchomej daje objętość retencji nie zatrzymywanego przez fazę stacjonarną składnika  $V_M$  i jest to całkowita objętość fazy ruchomej w kolumnie. Dla dowolnego procesu chromatograficznego prawdziwe jest równanie:

$$V_R = V_M + KV_S \quad \text{Równ. 2.1}$$

gdzie  $K$  jest współczynnikiem podziału w stanie równowagi (stężenie substancji w fazie nieruchomej / stężenie substancji w fazie ruchomej), a  $V_S$  jest objętością fazy nieruchomej.

Ważnym parametrem retencji w chromatografii jest *współczynnik pojemnościowy*  $k'$  zdefiniowany jako:

$$k' = K \frac{V_S}{V_M} \quad \text{Równ. 2.2}$$

Współczynnik pojemnościowy, który jest równy stosunkowi ilości składnika próbki w dwóch fazach, stanowi miarę stopnia chromatograficznego podziału, któremu podlega próbka w czasie swojej wędrówki przez kolumnę.

Wyrażenie  $k'$  jako funkcji czasu retencji daje:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

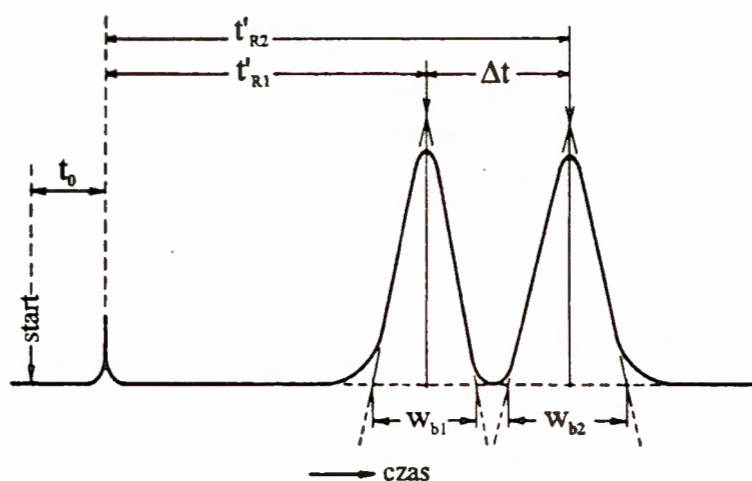
Równ. 2.3

Współczynnik pojemnościowy jest więc po prostu ilorazem zredukowanego czasu retencji i czasu retencji substancji nie oddziałującej z fazą stacjonarną.

### 2.3. Parametry związane z kolumną chromatograficzną

Zrozumienie pojęcia rozdzielania w chromatografii wymaga przede wszystkim ilościowego określenia stopnia rozdzielania za pomocą *zdolności rozdzielczej*  $R_s$  zwanej czasem *rozdzielczości*.

Badając chromatogram dwóch składników zauważamy, że stopień zachodzenia na siebie dwóch pasm zależy od dwóch właściwości: odległości między maksimami obu pików i szerokościami pasm.



Rys. 2.2 Graficzne przedstawienie rozdzielania pików [32]

Zdolność rozdzielczą definiujemy jako:

$$R_S = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad \text{Równ. 2.4}$$

gdzie  $w_{b1}$  i  $w_{b2}$  są szerokościami pasm wyznaczonymi przez punkty przecięcia z linią zerową stycznych do pików w punktach przegięcia ; a  $w_{h1}$  i  $w_{h2}$  są szerokościami pasm w połowie wysokości pików.

W przypadku szybkich rozdzieleń przyjmuje się, że wartość  $R_S=1$  oznacza już dobre rozdzielanie. Gdy  $R_S=1,5$  rozdzielanie jest stuprocentowe. W miarę gdy  $R_S$  przyjmuje wartości mniejsze od 1 pasma coraz bardziej zachodzą na siebie. Rozdzielenie jest zazwyczaj niezadowolające gdy  $R_S$  jest mniejsze niż 0,8.

Często charakteryzując rozdzielanie dwóch pików podaje się retencję względną  $\alpha$  zwaną współczynnikiem rozdzielania, czasem określaną jako *współczynnik selektywności*.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{Równ. 2.5}$$

Retencja względna odzwierciedla różnice w oddziaływaniu obu składników z fazą stacjonarną.  $\alpha$  równa się stosunkowi współczynników podziału w stanie równowagi obu składników i jest miarą termodynamicznych różnic w ich podziałach [33]:

$$\Delta(\Delta G^0) = -RT \ln \alpha \quad \text{Równ. 2.6}$$

gdzie  $\Delta(\Delta G^0)$  jest różnicą energii swobodnych podziału tych dwóch składników.

Sprawność kolumny chromatograficznej związana jest ze względnym poszerzeniem pasma substancji w kolumnie. Miarą sprawności kolumny jest *liczba pól* *teoretycznych* zdefiniowana w sposób następujący [30]:

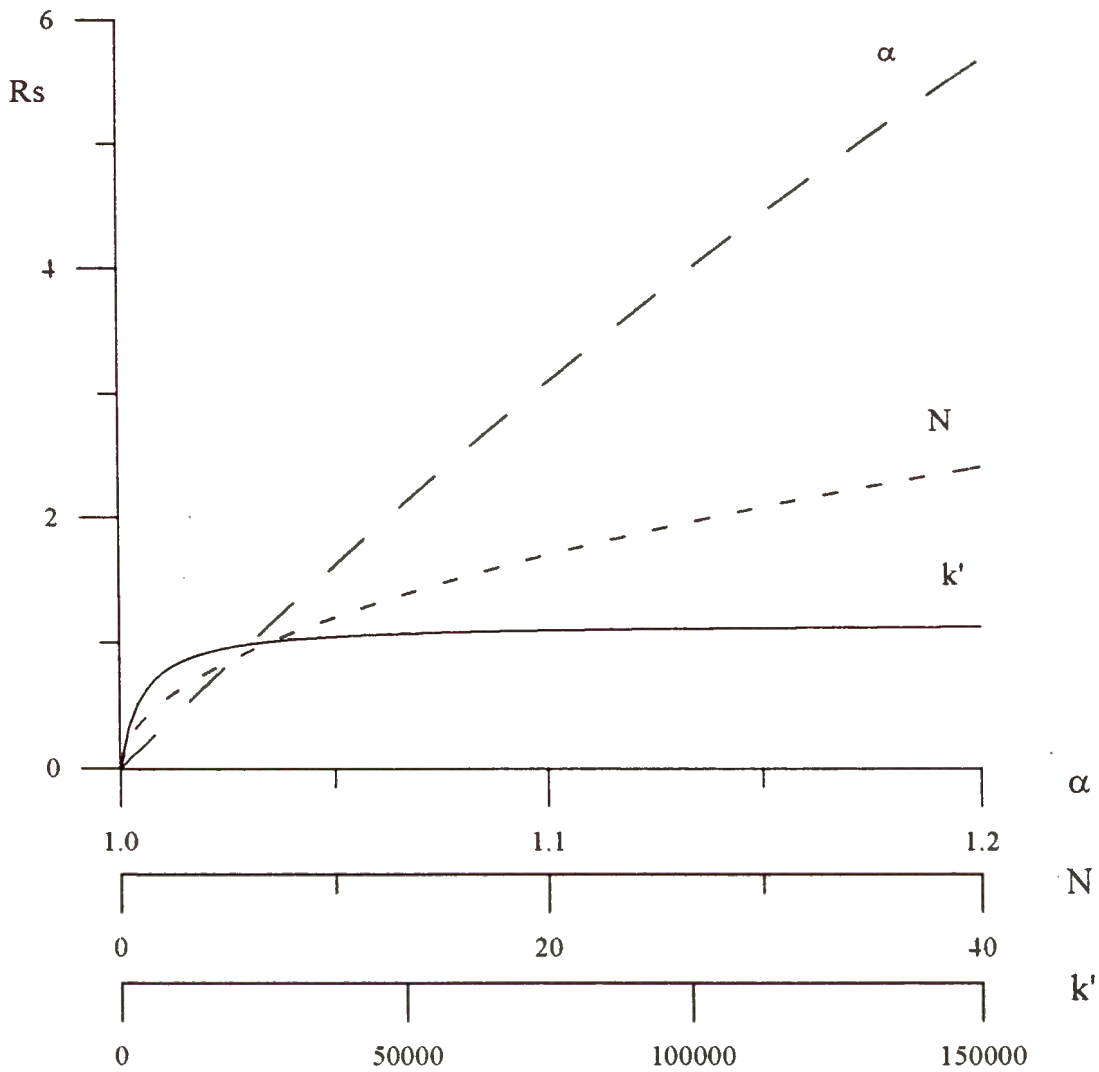
$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad \text{Równ. 2.7}$$

Z równania wynika, że liczba pól teoretycznych a stąd i sprawność rozdzielania kolumny rośnie w przypadku danego czasu retencji ze zmniejszającą się szerokością piku.

Uwzględniając powyższe definicje można przedstawić zależność pomiędzy zdolnością rozdzielczą  $R_s$  a podstawowymi parametrami chromatograficznymi [34]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2'}{k_2' + 1} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R2}} \quad \text{Równ. 2.8}$$

Wpływ każdego parametru na zdolność rozdzielczą przedstawia Rys. 2.3, gdzie do rozdzielania dwóch związków o  $k'$  odpowiednio 5,8 i 6,0 ( $\alpha=1,03$ ) użyto kolumny o 25000 pól. Zdolność rozdzielcza wynosi wtedy 0,98.



Rys. 2.3 Wykres zależności pomiędzy współczynnikiem rozdzielania  $\alpha$ , liczbą pól teoretycznych  $N$ , współczynnikiem pojemnościowym  $k$  a zdolnością rozdzielczą  $R_s$ [34]

Analiza zmian każdego parametru gdy dwa pozostałe pozostawione są na stałym poziomie prowadzi do następujących wniosków:

$\Rightarrow$  zmiany współczynnika pojemnościowego  $k_2'$  mają ograniczony wpływ na zdolność rozdzielczą. W przypadku dużych wartości  $k_2'$  ułamek  $k_2'/(k_2'+1)$  zdąży do jedności i przestaje odgrywać rolę w kształtowaniu zdolności rozdzielczej.

⇒ rozdzielanie dwóch pików jest proporcjonalne do pierwiastka kwadratowego ze sprawności kolumny; tak więc dwukrotnemu zwiększeniu zdolności rozdzielczej musi odpowiadać czterokrotne zwiększenie liczby pól teoretycznych.

⇒ retencja względna ma największy wpływ na zdolność rozdzielczą i z tego powodu jest zmienną która wymaga największej uwagi. Małe zmiany wartości  $\alpha$  powodują duże zmiany  $R_s$  zwłaszcza wtedy, gdy  $\alpha$  jest bliskie jedności. Tak np. zwiększenie  $\alpha$  od 1,1 do 1,2 (zmiana o 10%) powoduje w przybliżeniu podwojenie zdolności rozdzielczej ze względu na człon  $(\alpha-1)$ .

Inną wielkością chromatograficzną używaną czasami do określania sprawności kolumny jest *pojemność pikowa*. Definiuje się ją jako maksymalną liczbę pików, które mogą być rozdzielone w danym systemie chromatograficznym w zadanych warunkach. Pojemność pikowa -  $n$  jest funkcją liczby pól teoretycznych  $N$  oraz czasów retencji pierwszego i ostatniego pików. Obliczamy ją wg wzoru [35]:

$$n = 1 + \sqrt{\frac{N}{16}} \times \ln \frac{t'_{Rn}}{t'_{R1}} \quad \text{Równ. 2.9}$$

gdzie  $t'_{R1}$  i  $t'_{Rn}$  są zredukowanymi czasami retencji dla pierwszego i ostatniego pików.

Pojemność pikową danego systemu chromatograficznego można podwyższyć poprzez zastosowanie gradientu temperatury w czasie analizy.

#### 2.4. Analiza jakościowa

Analizę jakościową rozdzielanych substancji można przeprowadzić zasadniczo na dwa sposoby. Pierwszy polega na wykorzystaniu właściwości retencyjnych interesującego nas związku. Drugim sposobem jest wykorzystanie innych metod analitycznych sprzężonych z chromatografią gazową.



### 2.4.1. Identyfikacja za pomocą parametrów retencji

Parametry retencji takie jak: zredukowany czas retencji czy objętość retencji są wielkościami charakteryzującymi daną substancję i w przypadku zachowania tych samych warunków analizy są wielkościami stałymi. Na tej podstawie można identyfikować badaną substancję przez porównanie jej retencji z retencją wzorca. Jeżeli badana substancja i wzorzec mają tą samą retencję, możemy podejrzewać, że jest to ten sam związek. Ponieważ jednak wiele substancji może mieć podobne retencje, w celu zwiększenia pewności wyniku, identyfikację należy przeprowadzić na dwóch kolumnach chromatograficznych o różnej polarności i w różnych temperaturach.

Ze względu na to, że retencja jest zależna od takich parametrów jak:

- temperatura kolumny,
- prędkość przepływu i rodzaj gazu nośnego,
- rodzaj i ilość fazy stacjonarnej,
- wymiary kolumny,

porównywanie retencji jest w zasadzie ograniczone do analiz wykonanych w tych samych warunkach. Wielkością retencyjną, która omija te trudności jest *indeks retencji* wprowadzony przez Kovátsa w 1958 roku i dlatego często nazywany *indeksem Kovátsa* [36].

Indeks retencji dowolnej chromatografowanej substancji  $x$  wyznacza się w stosunku do retencji  $n$ -alkanów, jednego o  $z$ -atomach węgla w cząsteczce, eluowanego z kolumny przed substancją  $x$ , oraz drugiego o  $z+1$ -atomach węgla, eluowanego za substancją  $x$ . Przyjmujemy, że indeks retencji  $n$ -alkanu jest iloczynem liczby jego atomów węgla i liczby 100 (np. indeks retencji  $n$ -pentanu wynosi 500 a  $n$ -heptanu - 700).

Indeks retencji substancji  $x$  obliczamy wg wzoru:

$$I_x = 100z + 100 \frac{\log t'_R(x) - \log t'_R(z)}{\log t'_R(z+1) - \log t'_R(z)} \quad \text{Równ. 2.10}$$

Indeks retencji jest w znacznym stopniu niezależny od warunków analizy i przez to jest parametrem charakteryzującym dany związek w danej temperaturze i w obecności określonej fazy stacjonarnej. Zależność temperaturowa jest przy tym stosunkowo niewielka i wynosi zazwyczaj od 2 do 6 jednostek indeksu przy zmianie temperatury o 10°C.

#### 2.4.2. Identyfikacja za pomocą sprzężenia chromatografii z innymi metodami analitycznymi

Chromatografia gazowa nie daje odpowiedzi na temat struktury rozdzielanych związków, toteż jej sprzężenie z niektórymi metodami spektroskopowymi, które z kolei nie nadają się do badania mieszanin wieloskładnikowych, umożliwia rozwiązanie wielu problemów analitycznych.

Na pierwszym miejscu należy tu wymienić *sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS)*. Połączenie chromatografii gazowej i spektrometrii masowej jest korzystne ze względu na to, że w obu metodach analiza przebiega w fazie gazowej, charakteryzują się one wysoką czułością detekcji i mają porównywalne szybkości. Rozdzielone na kolumnie chromatograficznej substancje przepływają do spektrometru masowego, gdzie następuje ich jonizacja i fragmentacja. Na podstawie otrzymanego widma masowego można identyfikować badaną substancję, najczęściej przez porównanie jej widma z biblioteką widm masowych.

Innym połączeniem dającym dobre wyniki jakościowe jest *sprzężenie chromatografii gazowej ze spektroskopią w podczerwieni (GC-IR)*. Na podstawie otrzymanych widm

w podczerwieni rozdzielonych substancji można przy dobrej znajomości tej techniki określić strukturę analizowanych związków nawet nie dysponując widmem porównawczym.

## 2.5. Analiza ilościowa

Chromatografia gazowa umożliwia wykonanie analizy ilościowej rozdzielanych związków. Dokładność tej analizy zależy m.in. od jakości posiadanego przyrządu i związanego z tym utrzymania stałych warunków analizy (temperatury, przepływu gazu nośnego), rodzaju detektora i zakresu liniowości jego wskazań oraz sposobu zbierania danych.

O ilości substancji w analizowanej mieszaninie można wnioskować na podstawie wielkości odpowiadającego jej pików, gdyż wysokość i powierzchnia pików są proporcjonalne do ilości oznaczanego składnika. Obecnie najczęściej dokonuje się automatycznego pomiaru powierzchni pików za pomocą integratorów lub oprogramowania komputerowego. Jest to sposób najwygodniejszy i najbardziej precyzyjny.

Jednakowe ilości dwóch substancji nie zawsze dają takie same wielkości pików, ze względu na różną odpowiedź detektora na różne substancje. Aby zniwelować te różnice, często używa się *współczynników korekcyjnych*. Współczynniki korekcyjne można wyznaczać samemu lub korzystać z danych literaturowych. Współczynnik korekcyjny charakterystyczny dla substancji wyznacza się w stosunku do substancji porównawczej, którą został wybrany benzen. Wartości współczynników korekcyjnych są różne dla różnych detektorów.

Inną metodą również używaną w analizie ilościowej jest kalibracja.

*Kalibrację za pomocą wzorca zewnętrznego* wykonuje się wstrzykując znane ilości badanej substancji. Następnie sporządza się wykres zależności wielkości pików od stężenia badanego związku tzw. krzywa kalibracyjna. Na podstawie wykresu określa się stężenie badanej substancji mając wyznaczoną wielkość odpowiadającego mu pików.

*W kalibracji metodą wzorca wewnętrznego* do analizowanej próbki dodajemy określoną ilość substancji, która nie występuje w badanej mieszninie. Wzorzec nie powinien się w istotny sposób różnić pod względem ilości i właściwości od analizowanych związków. Obliczając stężenia interesujących nas związków porównujemy wielkości ich pików z pikiem wzorca.

### 3. Cyklodekstryny - budowa i zastosowanie

Cyklodekstryny zostały odkryte już pod koniec ubiegłego wieku przez Viliersa (1891 r.). Zostały one jednak opisane jako cykliczne oligosacharydy w 1904 r. przez Schardingera, dlatego są czasem określane jako dekstryny Schardingera. W 1938 r. Freudenberg ogłosił, że cyklodekstryny są zbudowane z jednostek glukozowych połączonych między sobą wiązaniem  $\alpha$ -1,4.

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił znaczny wzrost zainteresowania cyklodekstrydami co wyraziło się między innymi lawinowym wzrostem liczby publikacji poświęconej tym substancjom. Podczas gdy w 1984 r. zanotowano razem 425 publikacji, patentów i abstraktów konferencyjnych to w 1994 r. liczba ta wzrosła do 1421 [37].

#### 3.1. Otrzymywanie cyklodekstryn

Cyklodekstryny - dalej często określane skrótem CD, otrzymuje się poprzez enzymatyczną degradację skrobi - liniowego polisacharydu, który tworzy lewoskrętną spiralę z sześcioma jednostkami glukozy na jeden obrót. Transferaza glikozylowa (rodzaj amylazy) odłącza jeden "obrót" helisy skrobiowej i łączy oba końce tego fragmentu tworząc cząsteczkę cykliczną. Istnieje wiele mikroorganizmów zawierających transferazę glikozylową, ale dokładnie przebadane zostały enzymy z bakterii *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumoniae M5 a1* i *Bacillus stercorophilus*. Ponieważ enzymy te nie są zbyt specyficzne przy cięciu spirali skrobiowej, powstające cyklodekstryny zawierają od 6 do 12 jednostek glukozowych. Nie obserwuje się powstawania pięcioczłonowych cyklodekstryn, ze

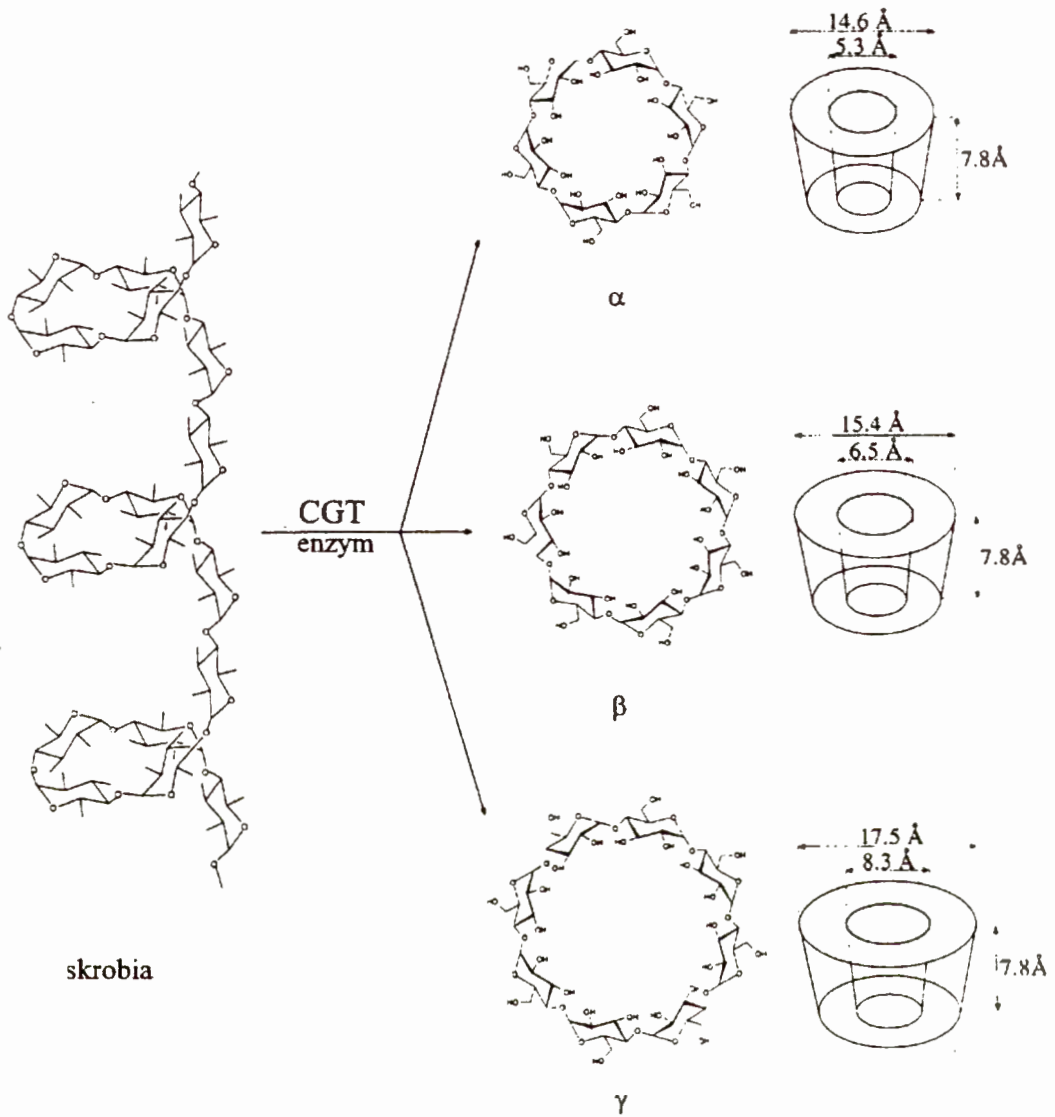
względu na zbyt duże naprężenia w pierścieniu, aczkolwiek udało się przeprowadzić stereoselektywną syntezę tego rodzaju cyklodekstryn [38].

Główna frakcja zawiera mieszaninę  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn (odpowiednio 6, 7 lub 8 jednostek glukozowych). Względne proporcje tych trzech cyklodekstryn zależą od typu enzymu i mogą być modyfikowane przez dodatek związków organicznych.

Transferaza glikozylowa z *Bacillus* No. 38-2 okazała się wysoce przydatnym enzymem do przemysłowej produkcji  $\beta$ -cyklodekstryny. Jest ciągle aktywna w 80°C i w zakresie pH 6-10 t.j. w warunkach które zapobiegają niszczeniu jej przez inne mikroorganizmy. 80% skrobi jest przekształcone w  $\beta$ -CD z niewielkimi jedynie ilościami pozostałych cyklodekstryn. Metoda ta ma również tę zaletę, że nie trzeba dodawać związków organicznych (które są często toksyczne) aby otrzymać wysoką wydajność  $\beta$ -CD [39].

### 3.2. Budowa cyklodekstryn

Cyklodekstryny są to związki cykliczne zbudowane z cząsteczek (+)- $\alpha$ -D-glukozowych połączonych między sobą mostkami tlenowymi  $\alpha$ -1,4. Jednostki glukozowe mają klasyczną konformację krzesłkową C1. Budowa taka nadaje cyklodekstrynom kształt ściętego stożka, z szerszą częścią otoczoną drugorzędowymi grupami hydroksylowymi i z częścią węższą otoczoną przez pierwszorzędowe grupy hydroksylowe. Liczba jednostek glukozowych decyduje o wielkości i kształcie wnętrza cyklodekstryny. Atomy wodoru i wolne pary elektronowe atomów tlenu wiązania glikozydowego skierowane są do wnętrza luki natomiast grupy hydroksylowe skierowane są na zewnątrz. Rezultatem takiego ustawienia grup funkcyjnych wewnątrz cyklodekstryny jest relatywnie hydrofobowe w porównaniu do wody natomiast część zewnętrzna jest hydrofilowa [40].



Rys. 3.1 Schemat powstawania i budowa cyklodekstryn[41]

### 3.3. Właściwości cyklodekstryn

Tabela 3.1 Wybrane właściwości cyklodekstryn

Rodzaj cyklodekstryny	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Masa molowa	973	1135	1297
Liczba jednostek glukozowych	6	7	8
Skrećalność $[\alpha]_{D25}$	+150,5	+162,5	+177,4
Objętość luki [ $\text{nm}^3$ ]	0,176	0,346	0,510
Punkt topnienia i rozkładu [K]	551	572	540
Liczba zainkludowanych cząsteczek wody (w roztworze)	6	11	17
Rozpuszczalność w wodzie w temp. 25°C [ $\text{g}/100 \text{ cm}^3$ ]	14,50	1,85	23,20

Zadziwiająco niska rozpuszczalność  $\beta$ -cyklodekstryny w wodzie (ok. 10 razy mniejsza niż rozpuszczalność  $\alpha$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryn) jest tłumaczona jej stosunkowo sztywną strukturą a stąd większymi zdolnościami do krystalizacji niż  $\alpha$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny [42] lub niekorzystną w stosunku do struktury wody 7-krotną symetrią  $\beta$ -cyklodekstryny [43].

### 3.4. Kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn

Zainteresowanie badaniami nad cyklodekstrynami wciąż rośnie. Opis ich struktury, właściwości oraz zastosowań jest przedmiotem wielu prac monograficznych [42-46], artykułów przeglądowych [39,40, 47], patentów i niezliczonej liczby publikacji.



Powodem tak dużego zainteresowania jest fakt, że cyklodekstryny są pierwszym i może dotychczas najważniejszym przykładem stosunkowo prostych cząsteczek organicznych o wybitnej zdolności do tworzenia kompleksów inkluzyjnych z innymi cząsteczkami oraz, że znalazły one szereg zastosowań praktycznych.

Formowanie kompleksów inkluzyjnych polega na wejściu cząsteczki gościa lub jego części do wnętrza cyklodekstryny czyli gospodarza przy czym nie są tworzone wiązania kowalencyjne pomiędzy gościem a gospodarzem.

Generalnie uważa się że siły biorące udział w tworzeniu się kompleksów to:

1. siły van der Waalsa pomiędzy hydrofobową częścią cząsteczki gościa a luką cyklodekstryny,
2. wiązanie wodorowe pomiędzy polarną grupą funkcyjną cząsteczki gościa i grupą hydroksylową cyklodekstryny,
3. uwalnianie się wysoko energetycznej cząsteczki wody z luki cyklodekstrynowej,
4. uwalnianie energii naprężeń pierścienia cyklodekstryny [42].

Bez względu jednak na rodzaj sił stabilizujących kompleks, głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za stabilność kompleksu jest przestrzenne dopasowanie cząsteczki gościa do luki gospodarza - CD, polarność gościa, temperatura i rodzaj rozpuszczalnika.

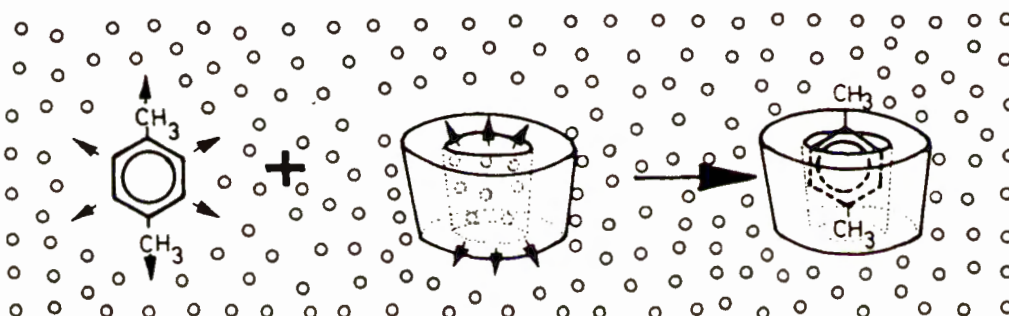
Jeśli cząsteczka gościa jest zbyt mała może ona łatwo wchodzić i wychodzić z luki CD tworząc słabe wiązania lub nie tworząc ich wcale. Formowanie się kompleksu z cząsteczką gościa znacznie większą niż luka CD jest również możliwe, ale wtedy tylko pewne grupy lub strony łańcucha cząsteczki gościa mogą penetrować lukę CD.

Stabilność kompleksu inkluzyjnego zależy także od polarności cząsteczki gościa i środowiska. Tylko związki o polarności mniejszej niż rozpuszczalnik mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne z CD. Stabilność kompleksu jest proporcjonalna do

hydrofobowego charakteru gościa. Cząsteczki wysoko hydrofilowe kompleksują się słabo lub wcale.

Dzięki tym właściwościom kompleksy z cyklodekstrynami mogą służyć do rozdzielania izomerów konstytucyjnych, konfiguracyjnych i diastereoizomerów. Ponadto ponieważ cyklodekstryny są zbudowane z (+)D-glukozy, same są również związkami chiralnymi - prawoskrętnymi i mogą być stosowane do tworzenia kompleksów diastereoizomerycznych z innymi cząsteczkami chiralnymi.

Generalnie kompleksy inkluzyjne z cyklodekstrynami mogą się tworzyć w roztworach lub w stanie krystalicznym.



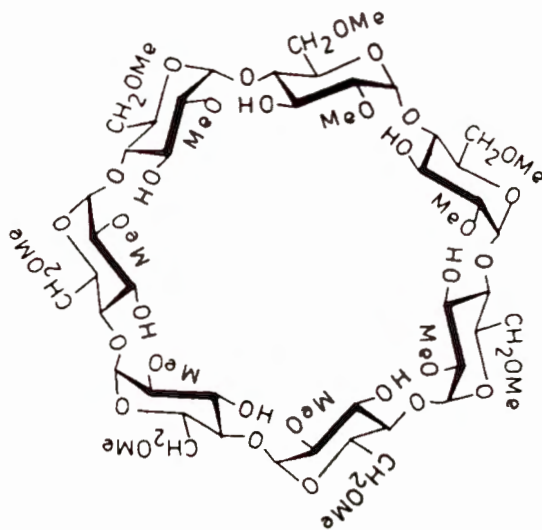
Rys. 3.2 Schemat tworzenia kompleksu inkluzyjnego przez cyklodekstrynę [46]

### 3.5. Pochodne cyklodekstryn

Właściwości cyklodekstryn mogą być modyfikowane poprzez tworzenie ich pochodnych. Cyklodekstryny zawierają 18 ( $\alpha$ -CD), 21 ( $\beta$ -CD) lub 24 ( $\gamma$ -CD) grup hydroksylowych, które mogą być chemicznie modyfikowane. Najbardziej reaktywna jest grupa OH przy węglu C-6, najmniej grupa OH przy węglu C-3. W efekcie podstawienia cyklodekstryny mogą zmieniać swoje właściwości - rozpuszczalność, hydrofobowość, temperaturę topnienia, właściwości inkluzyjne i in.

Rozpuszczalność pochodnej heptakis-(2,3,6-tri-O-metylo)- $\beta$ -cyklodekstryny w wodzie jest prawie 10 razy większa niż naturalnej  $\beta$ -cyklodekstryny i wynosi 17g/100ml.

Heptakis-(2,6-di-O-metylo)- $\beta$ -cyklodekstryna (Rys. 3.3) jest nierozpuszczalna w gorącej wodzie natomiast doskonale rozpuszcza się w wodzie zimnej [44].



Rys. 3.3 Struktura heptakis(2,6-di-O-metylo)- $\beta$ -cyklodekstryny.

### 3.6. Zastosowanie cyklodekstryn

Ze względu na swoje właściwości cyklodekstryny znalazły zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu a także w badaniach naukowych.

Praktyczne zastosowanie znalazły one m.in.:

- $\Rightarrow$  w przemyśle farmaceutycznym - do zwiększania rozpuszczalności leków, poprawienia ich fizycznych i chemicznych właściwości oraz powiększenia ich przyswajalności,
- $\Rightarrow$  w przemysłach: żywnościowym, kosmetycznym, tytoniowym - do stabilizacji zapachów i aromatów jak również do usuwania nieprzyjemnych zapachów, zanieczyszczeń mikrobiologicznych i innych niepożądanych substancji,
- $\Rightarrow$  w przemyśle chemicznym - jako katalizatory do zwiększenia selektywności reakcji a także do rozdziału i oczyszczania produktów.

### 3.7. Zastosowanie cyklodekstryn w chromatografii gazowej

W ostatnich latach cyklodekstryny i ich pochodne cieszą się dużym zainteresowaniem w chromatografii.

Dzięki temu że:

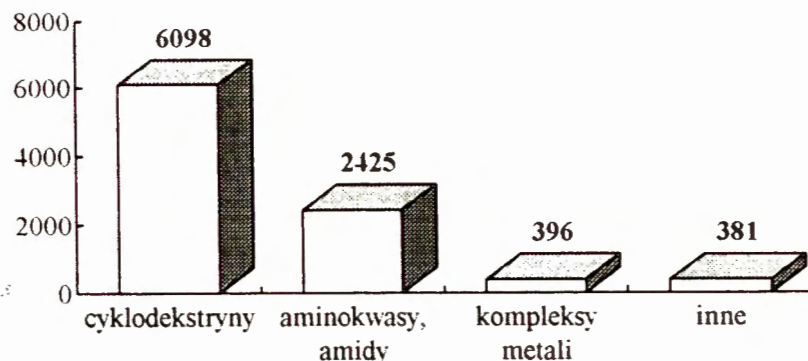
- ◆ kompleksowanie przez cyklodekstryny jest nie tylko wysoko selektywne ale ponadto stereoselektywne,
- ◆ procesy kompleksowania w roztworze są odwracalne i nie obserwuje się zjawiska histerezy,
- ◆ ustalanie się równowagi w roztworach jest stosunkowo szybkie,

połączenia te umożliwiają tworzenie wysoko selektywnych systemów chromatograficznych do rozdzielania mieszanin związków które w tradycyjnych systemach są bardzo skomplikowane bądź niemożliwe do uzyskania. Typowymi przykładami są rozdzielania enancjomerów, diastereoizomerów oraz izomerów konstytucyjnych. Cyklodekstryny zastosowano m.in. do modyfikowania takich metod chromatograficznych i technik pokrewnych, jak: chromatografia gazowa, klasyczna chromatografia cieczowa, wysokosprawna chromatografia cieczowa, chromatografia cienkowarstwowa i izotachoforeza.

Ponieważ w przedstawionych badaniach wykorzystywano metodę chromatografii gazowej, przegląd ten ograniczono do omówienia zastosowań cyklodekstryn w obrębie tej jednej metody ze względu na bardzo obszerną literaturę.

Chiralne fazy stacjonarne z cyklodekstrynami są obecnie najbardziej uniwersalnymi i powszechnie stosowanymi fazami stacjonarnymi do rozdzielania enancjomerów w chromatografii gazowej. Na rys. 3.4 został przedstawiony udział poszczególnych

typów chiralnych faz stacjonarnych. Można zauważyć znaczącą przewagę chiralnych faz stacjonarnych zawierających cyklodekstryny nad innymi typami.



Rys. 3.4 Liczba poszczególnych rodzajów chiralnych faz stacjonarnych w chromatografii [48]

O ile w chromatografii ciekowej cyklodekstryny można stosować do modyfikowania zarówno fazy stacjonarnej jak i ruchomej o tyle w chromatografii gazowej możliwe jest tylko ich użycie w fazie stacjonarnej.

Ze względu na rodzaj i sposób zastosowania cyklodekstryn w chromatografii gazowej można wymienić następujące systemy w których fazami stacjonarnymi są:

1. krystaliczne cyklodekstryny i ich krystaliczne pochodne,
2. polimery cyklodekstryn,
3. niskotopliwe pochodne cyklodekstryn,
4. roztwory cyklodekstryn w odpowiednich rozpuszczalnikach.

W dwóch pierwszych przypadkach cyklodekstryny są stosowane w systemie chromatografii adsorpcyjnej a w dwóch pozostałych w systemie chromatografii podziałowej.

### 3.7.1. *Krystaliczne cyklodekstryny i ich pochodne*

Zastosowanie naturalnych krystalicznych cyklodekstryń jako fazy stacjonarnej w gazowej chromatografii adsorpcyjnej zapoczątkowała Smolkova-Keulemansova [49], osadzając krystaliczne  $\alpha$ - i  $\beta$ -cyklodekstryny na chromosorbie z roztworu dwumetyloformamidu. Fazy te nadawały się do badania fizykochemicznych oddziaływań cyklodekstryń z różnego rodzaju związkami, nie miały jednak praktycznego zastosowania analitycznego [50 -52]. W ostatnich latach Armstrong et al. zastosowali chemicznie związane cyklodekstryny w kolumnach kapilarnych jako stałe fazy stacjonarne do rozdziału lekkich węglowodorów i gazów nieorganicznych [53-55].

### 3.7.2. *Polimery cyklodekstryń*

W 1980 r. japońscy badacze [56] zastosowali polimery poliuretanowo cyklodekstrynowe jako fazy stacjonarne w gazowej chromatografii adsorpcyjnej do rozdzielania szeregu alkoholi, ketonów, estrów izomerów ksilenów, pikoliny i lutydyny. Na podstawie zmierzonych czasów retencji wykazali, że cząsteczki cyklodekstryny usieciowane w polimerze, silnie oddziałują z cząsteczkami gości i mogą służyć np. do zagęszczania związków.

Ten system nie znalazł większego zastosowania analitycznego i dalsze badania nie były kontynuowane ze względu na powolny przebieg sorpcji.

### 3.7.3. Pochodne cyklodekstryn

Acetylowane pochodne cyklodekstryn jako ciekłe fazy stacjonarne zostały użyte po raz pierwszy już na początku lat 60-tych [57, 58]. Było to możliwe z tego względu, że pochodne te miały stosunkowo niskie punkty topnienia - ok. 200°C.

W tych warunkach nie zostało zaobserwowane zjawisko tworzenia kompleksów inkluzyjnych z badanymi substancjami ( $\alpha$ -olefiny, alkohole, estry) prawdopodobnie ze względu na wysoką temperaturę analiz t.j. ponad 200°C. W 1979 r. Casu et al. [59] zastosowali metylowane cyklodekstryny lub ich roztwory w oleju silikonowym jako ciekłe fazy stacjonarne. Zaobserwowali, że dodatek cyklodekstryny powoduje znaczne wydłużenie czasów retencji badanych substancji, co można wytłumaczyć tworzeniem kompleksów inkluzyjnych.

Pochodne cyklodekstryn jako chiralne fazy stacjonarne w kapilarnej chromatografii gazowej zostały zastosowane pod koniec lat 80-tych. König et al. użyli pentyłowanej pochodnej  $\beta$ -cyklodekstryny ze względu na jej niski punkt topnienia, jako ciekłej fazy stacjonarnej do rozdzielania enancjomerów niektórych pochodnych aldoz [60] oraz aminokwasów, aminoalkoholi i hydroksykwasów [61]. Schurig et al. zastosowali natomiast rozpuszczoną w polisiloksanie OV-1701 permetylowaną pochodną  $\beta$ -cyklodekstryny do rozdzielania racemicznych mieszanin wielu substancji [62,63].

Armstrong et al. uzyskali średnio polarne pochodne cyklodekstryn - 2, 6-di-O-pentylo-3-O-trifluoroacetylo- oraz O-(S)-2-hydroksypropylo- $\alpha$ , i  $\beta$ -cyklodekstryny, które zastosował bezpośrednio jako fazy stacjonarne w kapilarnej chromatografii gazowej do rozdzielania racematów ponad 100 związków należących do takich klas jak: aminy, aminoalkohole, epoksydy, furany, cukry, estry, ketony i in. [64, 65]. Następnym

krokiem było chemiczne związanie cyklodekstryny ze szkieletem polisiloksanowym a tym samym jej unieruchomieniem [66, 67].

Od tego czasu nastąpił lawinowy niemalże wzrost publikacji dotyczących rozdzielania enancjomerów różnego rodzaju związków, na kolumnach kapilarnych z zastosowaniem różnorodnych pochodnych cyklodekstryn. Było to spowodowane między innymi tym, że kolumny takie stały się dostępne komercyjnie.

Przygotowaniu kolumn i różnorodnym przykładom rozdzieleń enancjomerów jest poświęcona praca monograficzna [68]. Kolumny te są stosowane do rozdzielania enancjomerów wielu związków między innymi substancji zapachowych i aromatów [69, 70] oraz chiralnych składników olejków eterycznych [71-73].

Ten rodzaj stosowania cyklodekstryn w chromatografii gazowej charakteryzuje się stosunkowo niskimi współczynnikami rozdzielania  $\alpha$  (na ogół  $\alpha < 1,1$ ) uzyskiwanymi dla enancjomerów związków chiralnych. Konieczne jest więc tutaj stosowanie wysoko sprawnych kolumn kapilarnych o dużej liczbie póltek.

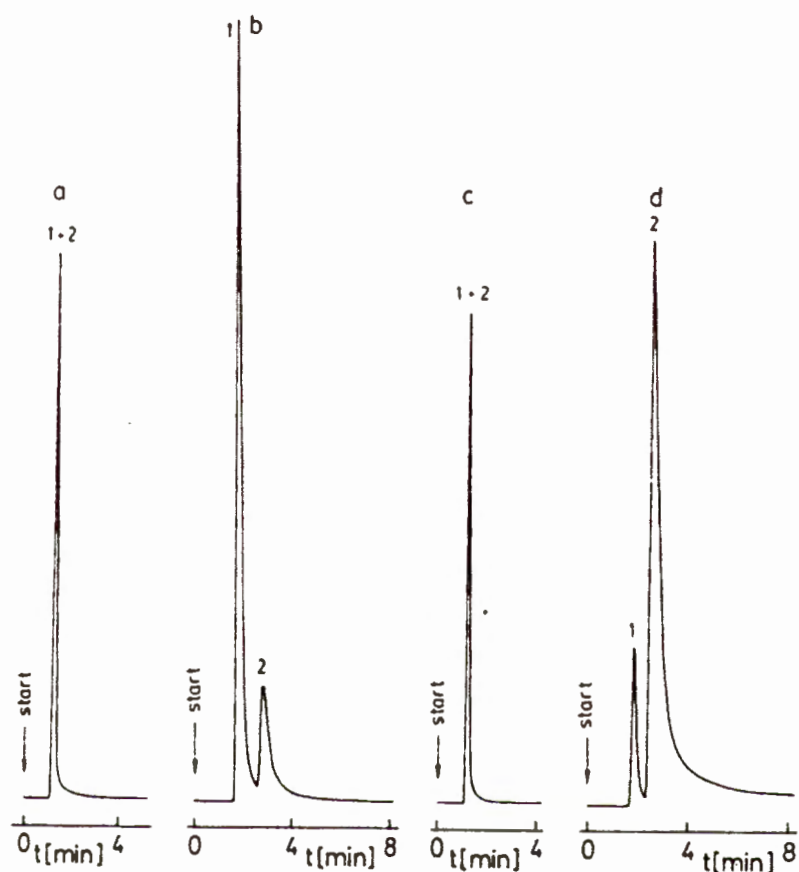
#### **3.7.4. Roztwory naturalnych cyklodekstryn**

Początkowo uważano, że cyklodekstryny mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne tylko w roztworach wodnych i z tego powodu nie stosowano ich w chromatografii gazowej.

Dopiero w 1983 r. Sybilska po raz pierwszy zastosowała formamidowe roztwory cyklodekstryn jako ciekłe fazy stacjonarne. Okazało się, że formamidowy roztwór  $\beta$ -cyklodekstryny umożliwia efektywne rozdzielanie izomerów o-, m-, p-ksylenów i etylobenzenu [74], natomiast rozpuszczona w formamidzie  $\alpha$ -cyklodekstryna umożliwiła rozdzielanie enancjomerów węglowodorów terpenowych  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenów



[75] - było to pierwsze udane rozdzielenie enancjomerów chiralnych substancji uzyskane w chromatografii gazowej na fazach zawierających cyklodekstrynę.



Rys. 3.5 Chromatogramy (+)- $\alpha$ -pinenu (a, b) i (-)- $\alpha$ -pinenu (c, d) otrzymane na kolumnach wypełnionych Celitem i pokrytych formamidem (a, c) oraz roztworem 1,84 mol%  $\alpha$ -CD w formamidzie. Temperatura 50°C; pik 1 - (+)- $\alpha$ -pinen, pik 2 - (-)- $\alpha$ -pinen [75].

W tym systemie cyklodekstryny zostały użyte m.in. do analizy stereoselektywnego uwodorniania  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenów do (+/-)-cis- i trans-pinanów [76, 77] oraz do rozdzielania izomerów cis- i trans-dimetylocykloheksanów [78], cis-, i trans-dekalin [79] i cis- i trans acyklicznych alkenów i cyklooktenu [80]. Z prac tych wynikało, że w badanym systemie jedynie  $\alpha$ -cyklodekstryna jest stereoselektywna względem enancjomerów chiralnych związków, natomiast  $\beta$ -cyklodekstryna jest bardziej

efektywna względem izomerów konfiguracyjnych cis-, trans-. Uzyskiwane współczynniki rozdzielania  $\alpha$ , zwłaszcza dla enancjomerów były wysokie.

Ten system chromatografii gazowej z zastosowaniem roztworów naturalnych cyklodekstryn został wykorzystany i zmodyfikowany w niniejszej pracy do rozdzielania izomerycznych mieszanin monoterpenuoidów.

## CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

### Wprowadzenie do części doświadczalnej

Część doświadczalna składa się z ośmiu rozdziałów:

- rozdział 4 obejmuje opis zastosowanej aparatury, kolumn chromatograficznych, odczynników i substancji badanych,
- rozdział 5 zawiera wyniki badań wstępnych, w których wykazano przydatność przedstawionej metody analitycznej do badania monoterpenoidów,
- w rozdziale 6 przedstawiono uproszczony model teoretyczny mechanizmów retencji w systemie chromatografii gazowej modyfikowanej cyklodekstrynami,
- rozdział 7 dotyczy wpływu poszczególnych cyklodekstryn oraz ich stężenia na chromatograficzne zachowanie się monoterpenów,
- w rozdziale 8 omówiona została rola gliceryny jako matrycy w przygotowaniu stereoselektywnych faz stacjonarnych,
- w rozdziale 9 opisany jest projekt systemu chromatograficznego naśladującego chromatografię dwuwymiarową oraz jego eksperymentalna weryfikacja,
- rozdział 10 poświęcony został praktycznym zastosowaniom opracowanych systemów chromatograficznych,
- rozdział 11 zawiera dyskusję najważniejszych wyników i wnioski końcowe.

## 4. Część eksperymentalna

### 4.1. Aparatura

Pomiary chromatograficzne przeprowadzono używając chromatografów gazowych firmy Hewlett-Packard, model 5890 (Avondale, USA) oraz model 5890 seria II (Waldbronn, Niemcy), wyposażonych w detektory płomieniowo jonizacyjne (FID). Pomiary czasów retencji i powierzchni pików były mierzone przy pomocy integratorów firmy Hewlett-Packard, model 3390A i 3396 seria II. Gazem nośnym był argon. Przepływ gazu nośnego wynosił 40 ml/min, jeśli nie zaznaczono inaczej.

### 4.2. Kolumny, wypełnienia i postępowanie

Stosowano kolumny szklane o wymiarach:

- 2m x 4mm
- 4m x 4mm

wypełnione Chromosorbem W NAW 60/80 mesh (w dalszym tekście oznaczanym jak Chromosorb), pokrytym roztworem cyklodekstryn przygotowanym jak podano poniżej.

Roztwór  $\alpha$ -,  $\beta$ - lub  $\gamma$ -cyklodekstryny w formamidzie lub glicerynie o odpowiednim stężeniu rozcieńczano wodą destylowaną a następnie dodawano do Chromosorbu.

Odpowiednie kolumny matrycowe były sporządzane bez dodatku cyklodekstryn. Do roztworu zawierającego  $\alpha$ -cyklodekstryne w celu polepszenia jej rozpuszczalności dodawano azotan litu ( $\text{LiNO}_3$ ). Otrzymana zawiesina była mieszana delikatnie przez kilka minut, następnie nadmiar wody był powoli usuwany za pomocą wyparki próżniowej w temp.  $40^\circ\text{C}$  pod ciśnieniem ok. 2,7 kPa.

Po upakowaniu kolumny zawierające formamid były kondycjonowane w temp. 50°C a kolumny zawierające glicerynę w 80°C.

Stężenia cyklodekstryn w rozpuszczalnikach są wyrażone w molalnościach [m] (liczba moli w 1000 g rozpuszczalnika) ponieważ podanie stężeń molowych [M] byłoby utrudnione.

### 4.3. Odczynniki

$\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny pochodziły z firmy Chinoïn (Budapeszt, Węgry).

Chromosorb W NAW 60/80 mesh pochodził z firmy Johns Manville (Litho, USA).

Pozostałe zastosowane odczynniki miały czystość cz. d. a.

### 4.4. Substancje badane

Wzorce większości terpenów to jest: (+) i (-)- $\alpha$ -pinenu, (+) i (-)- $\beta$ -pinenu, (+)-kamfenu, (+)-2-karenu, (+)-3-karenu, myrcenu,  $\alpha$ - i  $\gamma$ -terpinenu, ocymenu, cis/trans-izoeugenolu, cis/trans-izosafrolu, (+) i (-)-izopinokamfeolu, (+) i (-)-borneolu, (+) i (-)-kamfory, (+) i (-)-fenchonu, (+) i (-)-mentolu i neomentolu oraz (+) i (-)-pulegonu pochodziły z firmy Fluka (Buchs, Szwajcaria).

Ponadto wzorce:

- (+) i (-)-limonenu, (+)-kamfenu oraz (-)- $\alpha$ -felandrenu pochodziły z firmy Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Niemcy),

- terpinolenu,  $\alpha$ -tujenu oraz cis i trans-anetolu pochodziły z firmy Roth (Karlsruhe, Niemcy),

- (+) i (-)-kamfenu, (+)-sabinenu, izoborneolu, (+) i (-)-karwonu oraz (+)-terpinen-4-olu pochodziły z firmy Aldrich (Milwaukee, USA),

- (-)-terpinen-4-olu z firmy Acros (Geel, Belgium).

Jako wzorce niektórych substancji zastosowano olejki eteryczne, w których związek ten występował w dużym stężeniu, i tak:

- jako wzorzec (-)-sabinenu zastosowano olejek z nasion marchwi,
- jako wzorzec (-)-3-karenu zastosowano olejek pieprzu czarnego,
- jako wzorzec (+)- $\alpha$ -felendrenu zastosowano olejek kopru ogrodowego.

## 5. Badania wstępne

Celem badań opisanych w tym rozdziale było sprawdzenie czy idea zastosowania różnych cyklodekstryn do rozdzielania izomerycznych monoterpenu jest słuszna, oraz wstępne ustalenie zakresu badań podstawowych, które powinny doprowadzić do opracowania racjonalnej metody optymalizacji procesów rozdzielania złożonych mieszanin wybranych monoterpenuoidów.

Przed przystąpieniem do szczegółowych badań podstawowych należało na podstawie wstępnych ustaleń wybrać modelowe izomery monoterpenuoidów i ich mieszanin oraz w przybliżeniu określić jak zachowują się one na kolumnach podziałowych modyfikowanych  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstrynami.

Jak było szczegółowo omówione w części literaturowej, w chromatografii gazowej cyklodekstryny mogą być stosowane do modyfikowania jedynie fazy stacjonarnej, więc ich wpływ na chromatografowane związki objawia się przede wszystkim wydłużeniem czasów retencji tych substancji, które tworzą z nimi kompleksy inkluzyjne. Im dany kompleks jest trwalszy tym później będzie wmywany badany związek.

W zaprojektowanym systemie chromatograficznym zastosowano formamidowe roztwory naturalnych cyklodekstryn ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) o zbliżonych stężeniach jako ciekłe fazy stacjonarne.

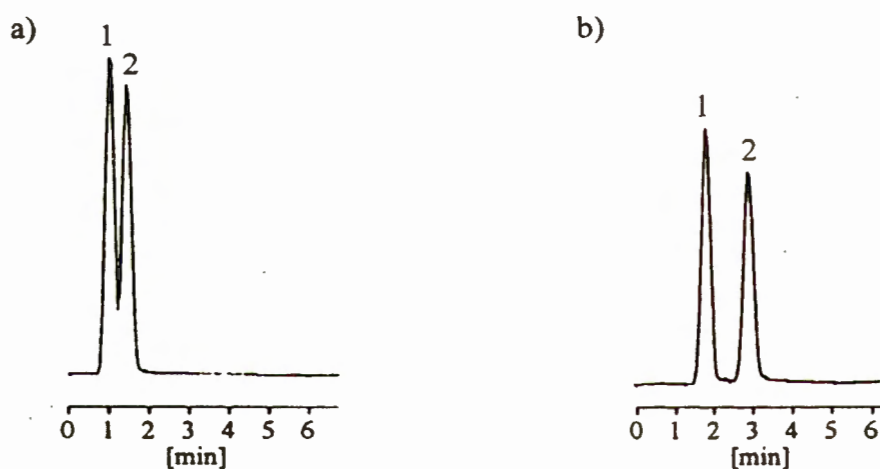
W celu sprawdzenia czy układy te nadają się do analizy chromatograficznej monoterpenuoidów przeprowadzono wstępne rozdzielania posługując się modelowym przykładem izomerycznych  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenuów w tym ich enancjomerów.

Aby odróżnić wpływ cyklodekstryn na chromatografowane związki od wpływu ich rozpuszczalnika - formamidu, oprócz kolumn zawierających cyklodekstryny

przygotowano również porównawcze kolumny matrycowe, zawierające tylko formamid. Ponieważ rozpuszczalność  $\alpha$ -cyklodekstryny w formamidzie okazała się stosunkowo niska, konieczne było dodanie do roztworu pewnej ilości azotanu litu  $\text{LiNO}_3$ , który umożliwił rozpuszczenie żądanej ilości  $\alpha$ -cyklodekstryny. Z tego powodu konieczne było również przygotowanie kolumny matrycowej zawierającej równoważną ilość azotanu litu.

Na rysunkach przedstawiono przykłady zarejestrowanych chromatogramów na :

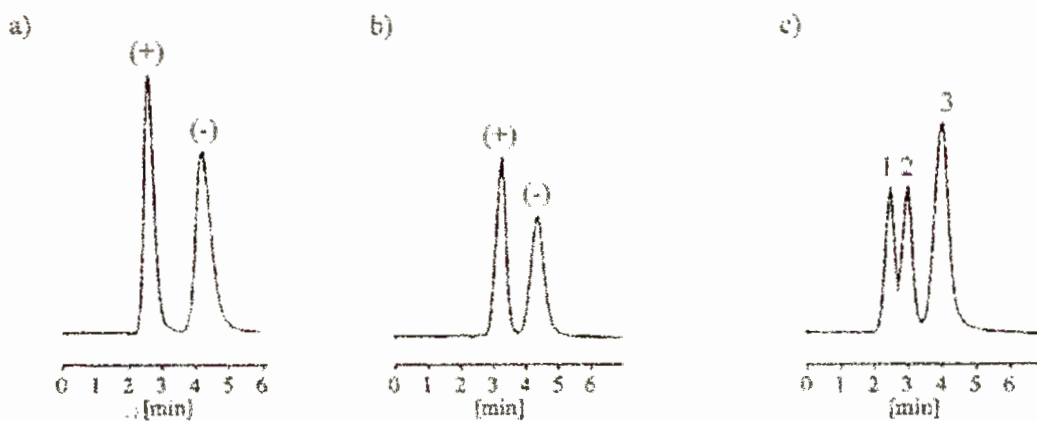
- achiralnych kolumnach matrycowych



Rys. 5.1 Chromatogramy mieszaniny izomerów (+/-)- $\alpha$ -pinenu (1) oraz (+/-)- $\beta$ -pinenu (2) uzyskane na kolumnach matrycowych o wymiarach 2 m x 4 mm wypełnionych Chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem azotanu litu o stężeniu 2,6 m (a) oraz czystym formamidem (b); temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min

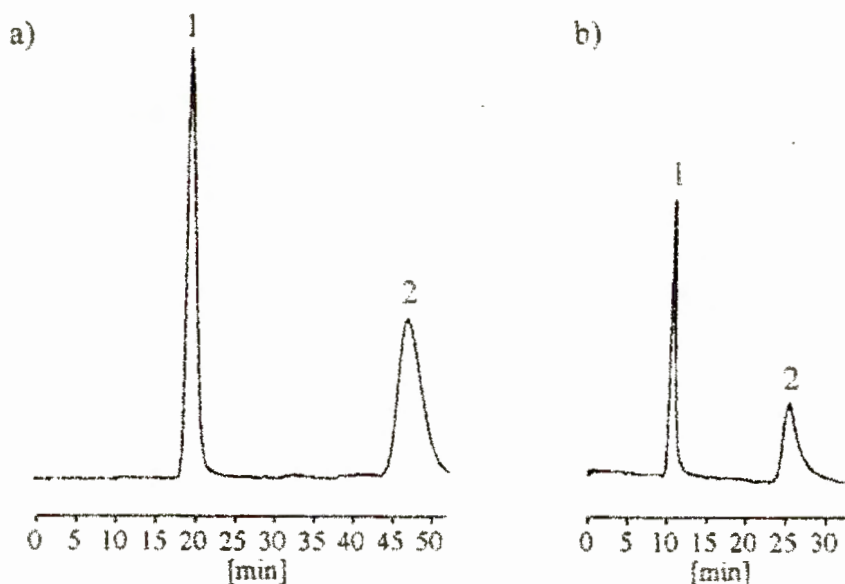


- na kolumnie z  $\alpha$ -cyklodekstryną,



Rys. 5.2 Chromatogramy mieszanin enancjomerów: (a) (+/-)- $\alpha$ -pinenów, (b) (+/-)- $\beta$ -pinenów oraz (c) (+)- $\alpha$ -pinenu (1), (+)- $\beta$ -pinenu (2), (-)- $\alpha$ -pinenu i (-)- $\beta$ -pinenu (3) uzyskane na kolumnie o wymiarach 2 m x 4 mm wypełnionej Chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,09 m; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min

- oraz na kolumnach z  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstrynami



Rys. 5.3 Chromatogramy mieszaniny izomerów (+/-)- $\alpha$ -pinenu (1) oraz (+/-)- $\beta$ -pinenu (2) uzyskane na kolumnach o wymiarach 2 m x 4 mm wypełnionych Chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\beta$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,08 m (a) oraz  $\gamma$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,09 m (b); temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min

Z przytoczonych przykładów wynika, że stereoselektywność układów z cyklodekstrynami jest znaczna i silnie zróżnicowana pomiędzy poszczególnymi jednostkami. Ponadto symetryczny kształt pików na przedstawionych chromatogramach świadczy o tym, że i pozostałe wymagania chromatografii dotyczące odwracalności i szybkości ustalania się równowagi są również spełnione.

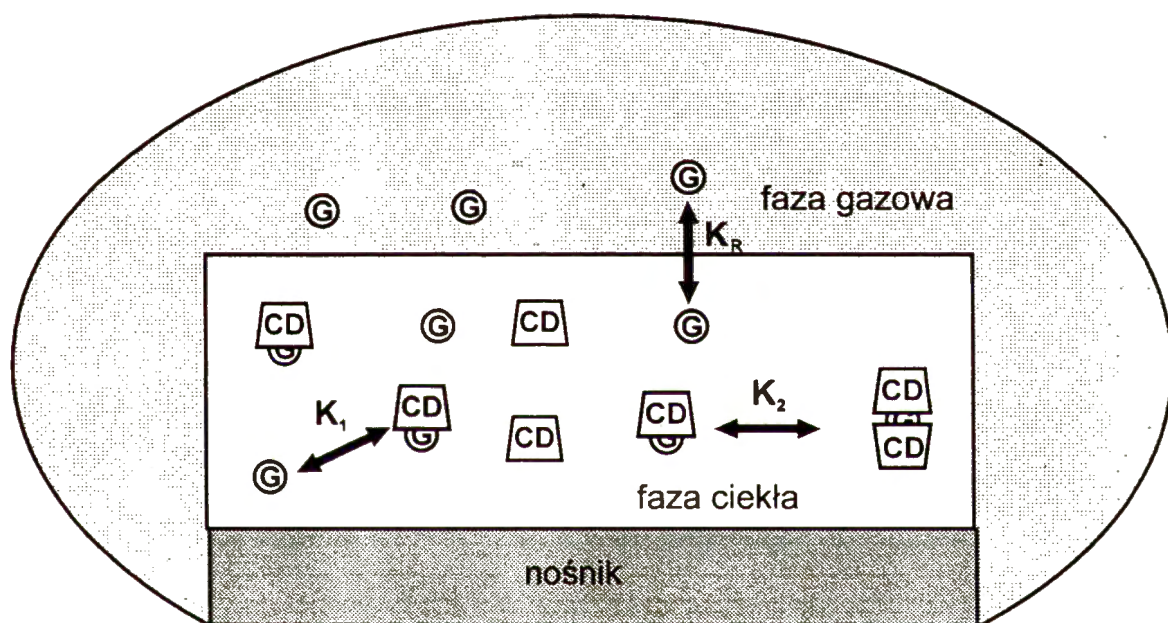
Wyniki uzyskane na dwóch kolumnach matrycowych (rys. 5.1) wskazują, że dodatek azotanu litu powoduje w przybliżeniu dwukrotne skrócenie czasów retencji.

Wyniki omówionych w tym rozdziale badań wstępnych wskazywały na trafność wyboru  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn do chromatograficznego różnicowania izomerycznych monoterpenoidów oraz umożliwiły ustalenie zakresu dalszych szczegółowych już badań podstawowych i praktycznych. Ostatecznie opracowana na podstawie dalszych badań szczegółowych metoda powinna podawać fenomenologiczne modele równowag i teoretyczny opis optymalizowanych systemów chromatograficznych.

## 6. Teoretyczny opis systemów z cyklodekstrynami

Rozważmy lotną cząsteczkę analizowanej substancji G przepływającą przez kolumnę której fazę stacjonarną stanowi rozcieńczony roztwór cyklodekstryny - CD w achiralnym rozpuszczalniku S.

Uproszczony schemat systemu chromatografii gazowej z fazą stacjonarną zawierającą rozpuszczone cyklodekstryny przedstawia rys 6.1.

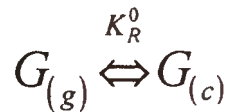


Rys. 6.1 Fenomenologiczny opis równowagi zachodzącej w kolumnie chromatograficznej.

Model oparto na założeniach:

- pomiędzy fazą gazową a ciekłą zachodzi tylko czysty proces podziału,
- inkluzja cząsteczek rozpuszczalnika w luce cyklodekstryny może być pominięta,
- adsorpcja cząsteczek cyklodekstryny na nośniku może być pominięta,
- układ znajduje się w liniowym zakresie izotermy podziału.

Proces podziału charakteryzujemy równowagą:



gdzie  $K_R^0$  - stanowi współczynnik podziału substancji G pomiędzy fazę gazową (g) a fazę ciekłą (c) nie zawierającą cyklodekstryny (matryca)

$$K_R^0 = \frac{[G_{(c)}]}{[G_{(g)}]}$$

Równ. 6.1

Proces kompleksowania cząsteczki G z  $n$  cząsteczkami cyklodekstryny w zależności od stechiometrii możemy zapisać:



$K_n$  - stanowi stałą trwałości kompleksu cząsteczki G z cyklodekstrynami:

$$K_n = \frac{[G \cdot CD_n]}{[G_c][CD]^n}$$

Równ. 6.2

W przypadku kolumny zawierającej cyklodekstrynę, współczynnik podziału jest równy:

$$K_R = \frac{[G_{(c)}]}{[G_{(g)}]} + \sum_n \frac{[G \cdot CD_n]}{[G_g]}$$

Równ. 6.3

Po przekształceniach otrzymujemy końcową formułę w postaci:

$$K_R = K_R^0 \left( 1 + \sum_n K_n [CD]^n \right)$$

Równ. 6.4

co w odniesieniu do czasów retencji daje relację:

$$t_R = t_R^0 \left( 1 + \sum_n K_n [CD]^n \right) \quad \text{Równ. 6.5}$$

gdzie  $t_R^0$  i  $t_R$  oznaczają zredukowane czasy retencji substancji G uzyskane odpowiednio na kolumnie matrycowej (bez dodatku cyklodekstryny) i na kolumnie z cyklodekstryną. Przyjmujemy, że kolumny matrycowa i cyklodekstrynowa mają te same parametry, różnią się od siebie jedynie obecnością cyklodekstryny.

W przypadku gdy zakładamy możliwość tworzenia się kompleksów jedynie o stechiometrii 1:1 wzory redukują się do postaci:

$$K_R = K_R^0 (1 + K_1 [CD]) \quad \text{Równ. 6.6}$$

gdzie  $K_1$  stanowi stałą trwałości cząsteczki G z cząsteczką cyklodekstryny.

Uzyskujemy liniową zależność czasów retencji od stężenia cyklodekstryny:

$$t_R = t_R^0 (1 + K_1 [CD]) \quad \text{Równ. 6.7}$$

Po uwzględnieniu tworzenia się kompleksów cyklodekstryny z badaną substancją o stechiometrii 2:1 wzory przybierają postać:

$$K_R = K_R^0 (1 + K_1 [CD] + K_2 [CD]^2) \quad \text{Równ. 6.8}$$

$K_1$  i  $K_2$  stanowią odpowiednio stałe trwałości kompleksów cząsteczki G z jedną i z dwoma cząsteczkami cyklodekstryny.

Daje to nam kwadratową zależność czasów retencji od stężenia cyklodekstryny:

$$t_R = t_R^0 (1 + K_1[CD] + K_2[CD]^2) \quad \text{Równ. 6.9}$$

W przypadku tworzenia się kompleksów o stechiometrii 1:1 wzór na współczynnik rozdzielania  $\alpha$  przyjmie postać:

$$\alpha = \frac{t_{R2}^0 (1 + K_{1b}[CD]) - t_0}{t_{R1}^0 (1 + K_{1a}[CD]) - t_0} \quad \text{Równ. 6.10}$$

ponieważ  $t_0 \ll t_R$  i  $(1 + K[CD]) > 1$  a dla dwóch enancjomerów tego samego związku

$t_{R2}^0 = t_{R1}^0$ , równanie upraszcza się do formy:

$$\alpha = \frac{K_{1b}[CD] + 1}{K_{1a}[CD] + 1} \quad \text{Równ. 6.11}$$

$K_{1a}$  i  $K_{1b}$  - oznaczają stałe trwałości kompleksów cząsteczek gościa wymywanego z kolumny jako pierwszy i jako drugi.

W przypadku tworzenia się kompleksów z cyklodekstryną o stechiometrii 1:2 współczynnik rozdzielania  $\alpha$  jest równy:

$$\alpha = \frac{t_{R2}^0 (1 + K_{1b}[CD] + K_{2b}[CD]^2) - t_0}{t_{R1}^0 (1 + K_{1a}[CD] + K_{2a}[CD]^2) - t_0} \quad \text{Równ. 6.12}$$

co po uproszczeniu podobnie jak w poprzednim równaniu daje wyrażenie:

$$\alpha = \frac{K_{2b}[CD]^2 + K_{1b}[CD] + 1}{K_{2a}[CD]^2 + K_{1a}[CD] + 1} \quad \text{Równ. 6.13}$$

$K_{2a}$  i  $K_{2b}$  oznaczają odpowiednio stałe trwałości kompleksów z cyklodekstrynami o stechiometrii 1:2, gościa G wymywanego z kolumny jako pierwszy i jako drugi.

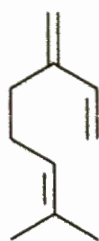
Podobne rozważania zostały przeprowadzone i wykorzystane w chromatograficznych badaniach kompleksów  $Ag^+$ -olefiny [81], kompleksów przeniesienia ładunku [82] w rozpuszczalnikach organicznych, kompleksów chlorków metali ze stopionymi solami [83] jak również w przypadku rozdzielania enancjomerów za pomocą kompleksów inkluzyjnych z roztworami pochodnych cyklodekstryn [84, 85].

## 7. Wpływ cyklodekstryn na chromatograficzne zachowanie się monoterpenów

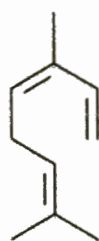
### 7.1. Wpływ rodzaju cyklodekstryny na kolejność elucji monoterpenów

Zaprojektowanie optymalnego układu chromatograficznego służącego do rozdzielania bardziej złożonych mieszanin izomerów związków monoterpenowych, wymagało w pierwszym etapie zbadania wpływu poszczególnych cyklodekstryn na chromatograficzne zachowanie się tych związków. W tym celu zmierzono czasy retencji wybranych modelowych monoterpenów na kolumnach z poszczególnymi cyklodekstrynami oraz porównawczo na kolumnach matrycowych. Związki modelowe zostały wybrane z uwagi na powszechność występowania w naturze, brana była również pod uwagę ich dostępność. Wzory strukturalne badanych substancji przedstawione są poniżej. Ze względu na budowę chemiczną można tu wyróżnić monoterpeny:

-acykliczne

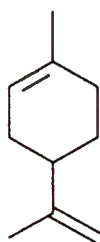


myrcen

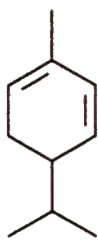
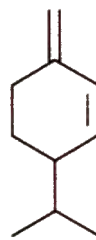
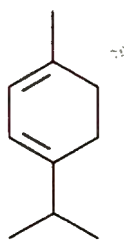
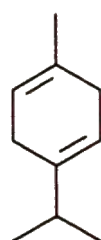
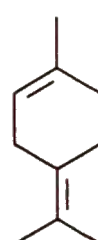


ocymen

## - monocykliczne

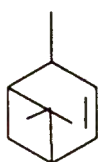
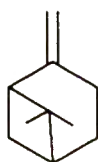
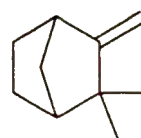


limonen

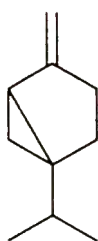
 $\alpha$ -felandren $\beta$ -felandren $\alpha$ -terpinen $\gamma$ -terpinen

terpinolen

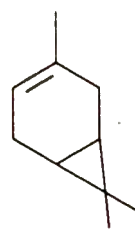
## - bicykliczne

 $\alpha$ -pinen $\beta$ -pinen

kamfen



sabinen

 $\alpha$ -tujen

3-karen

Wszystkie wymienione powyżej monoterpeny są wobec siebie izomerami konstytucyjnymi, ponadto wszystkie zaprezentowane monoterpeny bicykliczne czyli  $\alpha$ - $\beta$ -pinen, kamfen, sabinen,  $\alpha$ -tujen i 3-karen, oraz z grupy monoterpenów



monocyklicznych limonen,  $\alpha$ -felandren i  $\beta$ -felandren są substancjami chiralnymi i mogą występować w dwóch formach enancjomerycznych.

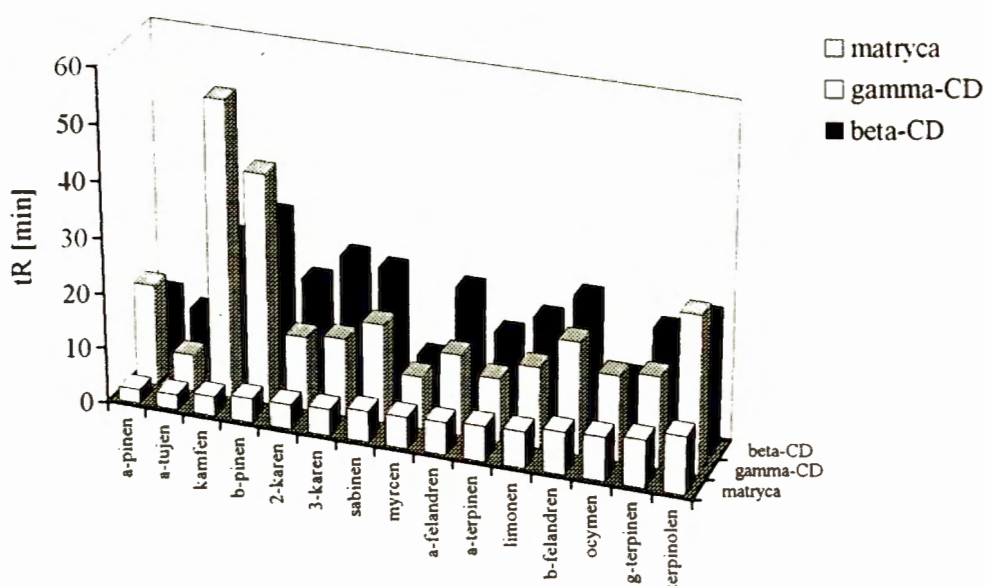
Zebrane czasy retencji monoterpenu na kolumnach z poszczególnymi cyklodekstrynami oraz na kolumnach matrycowych przedstawia Tabela 7.1 oraz Tabela 7.2.

Stężenia poszczególnych cyklodekstryn nie są jednakowe, zostały jednak tak dobrane aby czasy retencji poszczególnych monoterpenu były optymalne. Jak wykazały badania wstępne czasy retencji danego związku znacznie różnią się między sobą w zależności od rodzaju cyklodekstryny.

Ponieważ kolumna z  $\alpha$ -cyklodekstryną zawiera azotan litu, dane retencyjne uzyskane na tej kolumnie porównano z danymi uzyskanymi na matrycy z równoważną zawartością azotanu litu. Z tego również powodu, dane te przedstawione są w oddzielnej tabeli.

Tabela 7.1 Zredukowane czasy retencji  $t'_R$  (min) otrzymane na kolumnie matrycowej oraz na kolumnach z  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryną o wymiarach 2 m x 4 mm (stężenia molalne podane w tabeli), temp.: 40°C, przepływ gazu nośnego (Ar): 40 ml/min.

Nazwa związku	matryca	0,026 m $\beta$ -CD	0,137 m $\gamma$ -CD
(+/-)- $\alpha$ -pinen	2,5	13,5	18,4
(+/-)- $\alpha$ -tujen	2,7	11,4	6,6
(+/-)-kamfen	3,5	25,8	53,4
(+/-)- $\beta$ -pinen	4,3	30,8	41,4
(+/-)-2-karen	4,4	20,3	13,3
(+/-)-3-karen	4,7	25,5	14,1
(+/-)-sabinen	5,5	24,3	17,8
myrcen	5,6	9,5	9,4
(+/-)- $\alpha$ -felandren	5,8	23,0	14,5
$\alpha$ -terpinen	6,3	15,9	11,3
(+/-)-limonen	6,5	19,8	14,5
(+/-)- $\beta$ -felandren	7,6	24,7	20,2
ocymen	7,9	11,5	15,3
$\gamma$ -terpinen	8,6	21,1	16,3
terpinolen	10,4	24,4	28,4



Rys. 7.1 Zredukowane czasy retencji  $t'_R$  (min) uzyskane na kolumnie matrycowej oraz na kolumnach zawierających  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny; warunki analityczne jak w tabeli 7.1.

Tabela 7.2 Zredukowane czasy retencji  $t'_R$  (min) otrzymane na kolumnie matrycowej i kolumnie z  $\alpha$ -cyklodekstryną o wymiarach 2 m x 4 mm (stężenie molalne podane w tabeli), temp.: 40°C, przepływ gazu nośnego (Ar): 40 ml/min.

Nazwa związku	matryca	0,152 m $\alpha$ -CD
(+)- $\alpha$ -pinen	1,1	6,4
(-)- $\alpha$ -pinen		13,9
(+)- $\alpha$ -tujen	1,2	5,1
(-)- $\alpha$ -tujen		9,3
(+)-kamfen	1,5	5,2
(-)-kamfen		12,6
(+)- $\beta$ -pinen	1,5	5,9
(-)- $\beta$ -pinen		9,8
(+)-3-karen	1,8	44,9
(-)-3-karen		49,1
(+)-sabinen	2,2	5,2
(-)-sabinen		7,1
myrcen	2,4	3,6
(+)- $\alpha$ -felandren	2,4	6,6
(-)- $\alpha$ -felandren		9,7
$\alpha$ -terpinen	2,5	4,1
(+)-limonen	2,4	6,2
(-)-limonen		5,7
ocymen	2,6	5,4
$\gamma$ -terpinen	2,8	5,5
terpinolen	3,0	5,1

Na podstawie zestawionych w tabelach wyników oraz wykresu można zauważyć, że:

- czasy retencji na kolumnach cyklodekstrynowych są dłuższe niż na porównawczych kolumnach matrycowych czyli wszystkie trzy cyklodekstryny tworzą kompleksy inkluzyjne z badanymi związkami,
- różna jest kolejność wymywania badanych monoterpenów na kolumnie matrycowej oraz na kolumnach z poszczególnymi cyklodekstrynami co oznacza, że trwałość

tworzonych kompleksów inkluzyjnych jest zależna od dopasowania kształtu cząsteczki monoterpenu do luki konkretnej cyklodekstryny,

- $\beta$ -cyklodekstryna najbardziej wydłuża czasy retencji w badanych układach, stąd wniosek, że tworzy najtrwalsze kompleksy z badanymi substancjami,
- w badanych układach jedynie  $\alpha$ -cyklodekstryna jest enancjoselektywna - umożliwia rozdzielanie enancjomerów, natomiast bardzo słabo rozróżnia lub nie rozróżnia izomerów konstytucyjnych w przeciwieństwie do  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn, które nie wykazują dostrzegalnej enancjoselektywności za to w znacznym stopniu rozróżniają izomery konstytucyjne,
- współczynniki rozdzielania  $\alpha$  dla enancjomerów badanych związków uzyskiwane na kolumnie z  $\alpha$ -cyklodekstryną są bardzo wysokie.

Przytoczone wyniki były podstawą do zaprojektowania pierwszego etapu optymalizacji, który polegał na wyborze odpowiedniej cyklodekstryny do rozdzielania określonego typu izomerów.

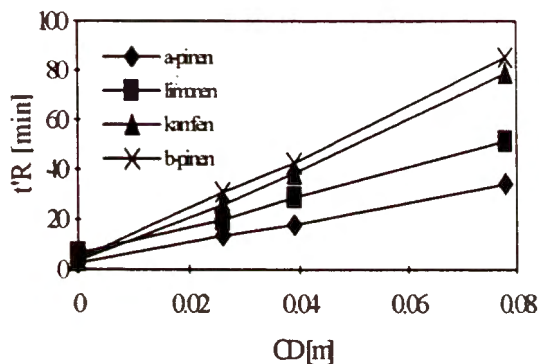
## **7.2. Wpływ stężenia naturalnych cyklodekstryn na podstawowe parametry chromatograficzne**

W następnym etapie optymalizacji układu chromatograficznego służącego do rozdzielania grupy związków monoterpenu zbadano wpływ stężenia cyklodekstryn na podstawowe parametry chromatograficzne to znaczy: czas retencji i współczynnik rozdzielania. Parametry te uzyskano i obliczono dla czterech modelowych par enancjomerów t.j.  $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, kamfenu oraz limonenu, w układach z kolumnami zawierającymi różne stężenia  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryny.

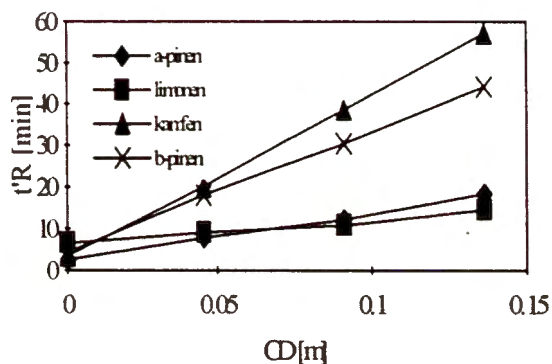
### 7.2.1. Wpływ stężenia $\beta$ - i $\gamma$ -cyklodekstryny na chromatograficzne zachowanie się monoterpenów

Rys. 7.2 prezentuje wykresy zależności czasów retencji badanych monoterpenów od stężenia  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn.

a)



b)



Rys. 7.2 Wykresy zależności zredukowanych czasów retencji  $t'_R$  dla  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenów, kamfenu i limonenu od stężenia  $\beta$ - (a) i  $\gamma$ -cyklodekstryny (b); kolumny o wymiarach 2 m x 4 mm; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego 40 ml/min

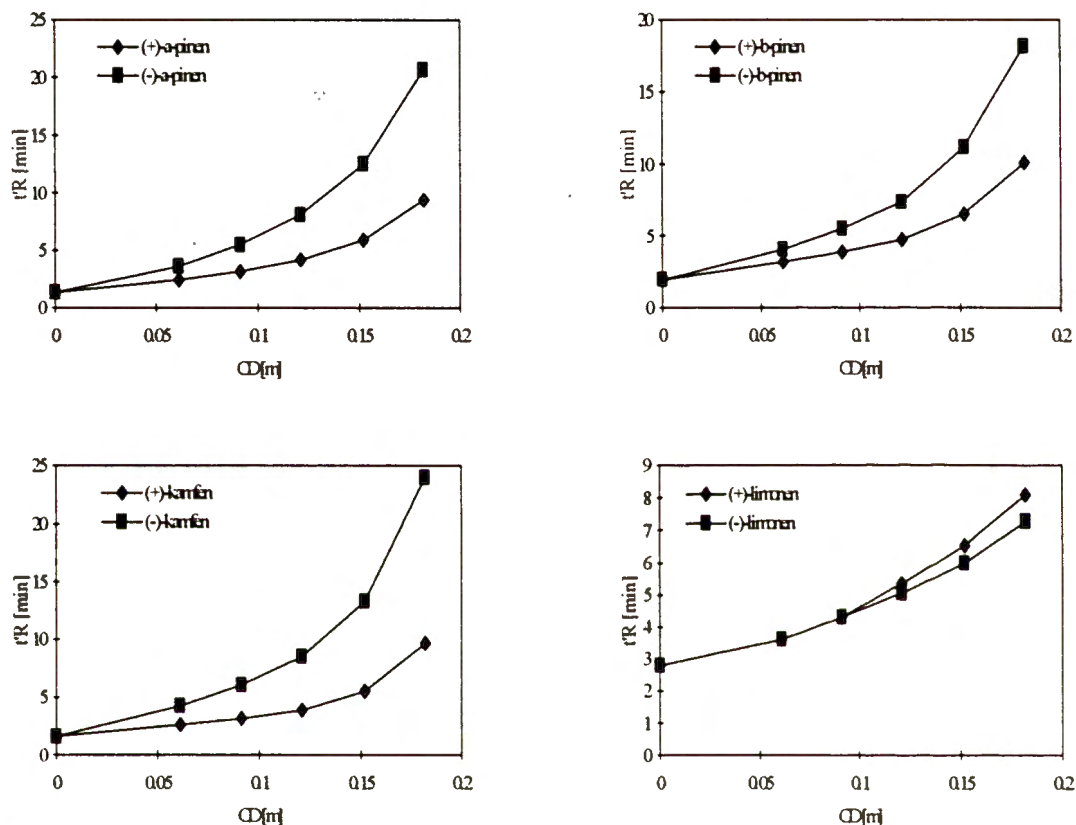
W obydwu przypadkach w zbadanym zakresie stężeń  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny można zaobserwować liniową zależność zredukowanych czasów retencji badanych monoterpenów od stężenia tych cyklodekstryn. Pozwala to przypuszczać, że w tych warunkach tworzą się kompleksy cyklodekstryn z monoterpenami o stechiometrii 1:1 zgodnie z równaniem 6.7:

$$t_R = t_R^0(1 + K_1[CD])$$

wyprowadzonym i przedyskutowanym szczegółowo w poprzednim rozdziale.

### 7.2.2. Wpływ stężenia $\alpha$ -cyklodekstryny na chromatograficzne zachowanie się terpenów

Rys. 7.3 przedstawia wykresy zależności zredukowanych czasów retencji otrzymanych dla modelowych czterech par enancjomerów monotерpenów ( $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, kamfenu oraz limonenu), od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny.

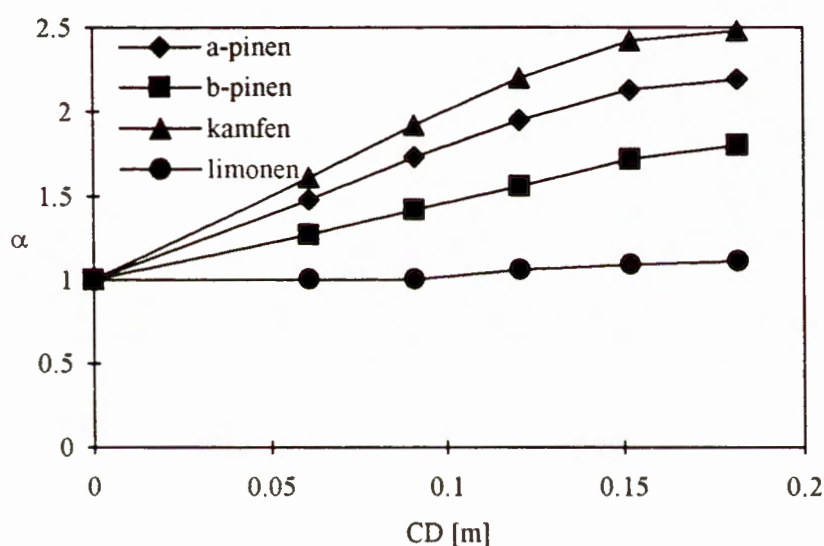


Rys. 7.3 Wykres zależności zredukowanych czasów retencji  $t'_R$  [min] dla  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenów, kamfenu i limonenu od stężenia molalnego  $\alpha$ -cyklodekstryny; wymiary kolumn 2m x 4mm, temp. 40°C, przepływ gazu nośnego 40 ml/min

W odróżnieniu do  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny, zależność czasów retencji wybranych monotерpenów od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny nie jest liniowa.

Wobec niskich stężeń  $\alpha$ -cyklodekstryny (od 0 do ok. 0,12 m) przyrosty czasów retencji są umiarkowane natomiast powyżej stężenia 0,15 m obserwujemy znaczne wydłużenie czasów retencji.

Rys. 7.4 prezentuje wykres zależności obliczonych współczynników rozdzielania -  $\alpha$  badanych czterech par enancjomerów od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny. Możemy zaobserwować asymptotyczny przebieg uzyskanych krzywych. Podobne zależności uzyskano w przypadku kolumn z pochodnymi cyklodekstryn [86, 87]. Współczynnik rozdzielania  $\alpha$  rośnie na początku bardzo szybko, natomiast począwszy od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny ok. 0,15 m przyrost jest już stosunkowo nieznaczny.



Rys. 7.4 Wykres zależności współczynnika rozdzielania  $\alpha$  od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny w roztworze formamidu, temp. 40°C, przepływ gazu nośnego 40 ml/min

Z wybranych czterech par enancjomerów badanych monoterpenu nieco odmiennie zachowuje się limonen. Uzyskane współczynniki rozdzielania dla limonenu są znacznie niższe niż dla pozostałych związków, nie obserwujemy też znacznego wydłużenia czasów retencji. Limonen tworzy dużo słabsze kompleksy z  $\alpha$ -cyklodekstryną i kompleksy te cechuje stosunkowo słaba stereoselektywność.

Na podstawie przedstawionych wykresów możemy zauważyć że, przy stężeniu  $\alpha$ -cyklodekstryny ok. 0,15 m uzyskujemy już bardzo dobre współczynniki rozdzielania  $\alpha$  dla enancjomerów badanych substancji. Dalsze zwiększanie stężenia prowadzi już tylko do nieznacznego podwyższenia współczynnika rozdzielania kosztem dużego wydłużenia czasów retencji, co znacznie wydłuża przebieg analizy.

Powyższe doświadczenia pozwoliły wybrać optymalne stężenie  $\alpha$ -cyklodekstryny do uzyskania rozdzielenia badanych związków na poziomie 0,15m.

Na podstawie powyższych rezultatów możemy zauważyć odmienne zachowanie się  $\alpha$ -cyklodekstryny w stosunku do  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn w badanych systemach.

Liniowa zależność czasów retencji od stężenia  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn - zgodnie z równaniem 6.7 świadczy o tworzeniu się kompleksów o stechiometrii 1:1 w badanym zakresie stężeń. Natomiast w przypadku  $\alpha$ -cyklodekstryny, zależność czasów retencji badanych monoterpenu od jej stężenia jest kwadratowa, wskazuje to na tworzenie się kompleksów CD-badana substancja o stechiometrii 2:1 - zgodnie z równaniem 6.9 wyprowadzonym w rozdziale 6.

Powyższe przypuszczenia są zgodne z rezultatami otrzymanymi przez Botsi et al. [88].

Autorzy badali kompleksy (+) i (-)- $\alpha$ -pinenów z różnymi cyklodekstrynami w roztworach wodnych za pomocą techniki NMR. Z badań tych wynikało, że  $\alpha$ -cyklodekstryna tworzy z cząsteczkami  $\alpha$ -pinenów kompleksy o stechiometrii 2:1, a  $\beta$ -cyklodekstryna tworzy kompleksy o stechiometrii 1:1. Ponadto jedynie  $\alpha$ -cyklodekstryna jest wybitnie enancjoselektywna w stosunku do enancjomerów (+) i (-)- $\alpha$ -pinenu.



### 7.3. Szacowanie stałych trwałości kompleksów monoterpenów z cyklodekstrynami

Wzory wyprowadzone w rozdziale 6 oraz dane retencyjne umożliwiają oszacowanie stałych trwałości kompleksów inkluzyjnych jakie tworzą cyklodekstryny z badanymi monoterpenami. Analiza oszacowanych stałych trwałości powinna dać odpowiedź na pytanie czy istnieje dostrzegalny związek pomiędzy budową cząsteczki monoterpeno- gościa a trwałością tworzonych przez niego kompleksów z poszczególnymi cyklodekstrynami?

#### 7.3.1. Szacowanie stałych trwałości kompleksów monoterpenów z $\beta$ - i $\gamma$ -cyklodekstryną

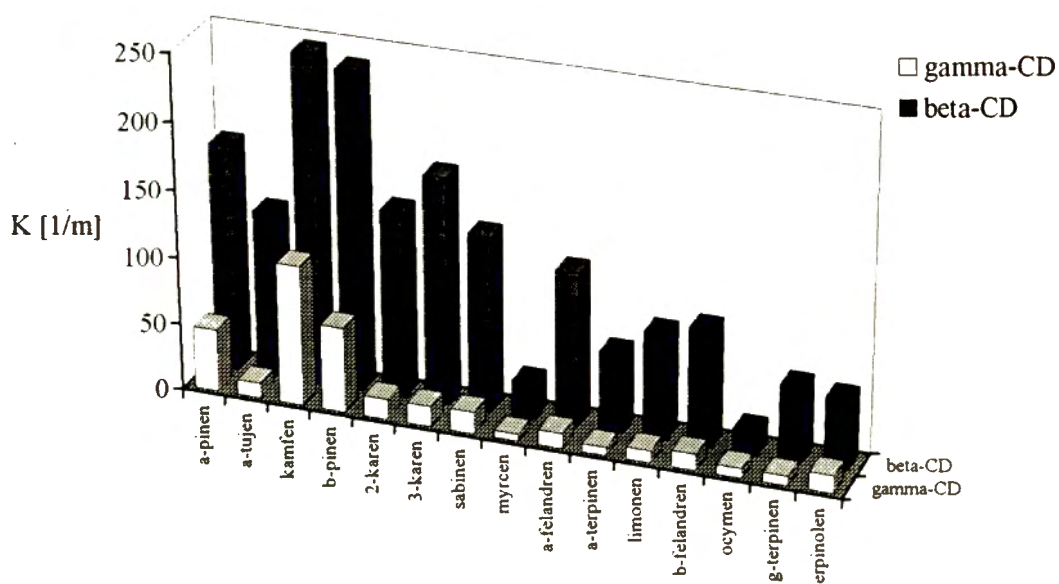
W przypadku gdy tworzą się kompleksy o stechiometrii 1:1, przekształcając równanie 6.7 otrzymuje się wyrażenie na  $K_1$ :

$$K_1 = \frac{t_R - t_R^0}{t_R^0 [CD]}$$

Korzystając z tego wzoru można wyznaczyć stałe trwałości kompleksów, które tworzą badane monoterpeny z  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -cyklodekstryną, ponieważ w tych przypadkach w badanych układach, jak wykazano w poprzednim podrozdziale tworzą się kompleksy o stechiometrii 1:1. Tabela 7.3 przedstawia stałe trwałości poszczególnych kompleksów obliczone na podstawie danych retencyjnych przedstawionych w tabeli 7.1.

Tabela 7.3 Stałe trwałości kompleksów monoterpenów z  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -cyklodekstryną w formamidzie; temp. 40°C.

Nazwa związku	K ( $\beta$ -CD) [ $m^{-1}$ ]	K ( $\gamma$ -CD) [ $m^{-1}$ ]
(+/-)- $\alpha$ -pinen	169	46
(+/-)- $\alpha$ -tujen	124	11
(+/-)-kamfen	245	104
(+/-)- $\beta$ -pinen	237	63
(+/-)-2-karen	139	15
(+/-)-3-karen	170	15
(+/-)-sabinen	131	16
myrcen	27	5
(+/-)- $\alpha$ -felandren	114	11
$\alpha$ -terpinen	59	6
(+/-)-limonen	79	9
(+/-)- $\beta$ -felandren	87	12
ocymen	18	7
$\gamma$ -terpinen	56	7
terpinolen	52	13

Rys. 7.5 Stałe trwałości kompleksów monoterpenów z  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryną w formamidzie, temp. 40°C.

Na podstawie wyżej przytoczonej tabeli i diagramu można zauważyć, że:

- ◆ wszystkie badane monoterpény tworzą trwalsze kompleksy z  $\beta$ - niż z  $\gamma$ -cyklodekstryną, co może sugerować, że luka  $\beta$ -cyklodekstryny jest bardziej “dopasowana” wielkością do badanych związków niż  $\gamma$ -cyklodekstryna, która wydaje się zbyt duża do formowania trwalszych kompleksów z monoterpunami,
- ◆ najtrwalsze kompleksy w przypadku tak  $\beta$ - jak i  $\gamma$ -cyklodekstryny tworzą dwa bicykliczne monoterpény -  $\beta$ -pinen i kamfen, które w porównaniu z pozostałymi związkami w tej grupie mają najbardziej “zwartą, kulistą” budowę dzięki czemu mogą głębiej zanurzyć się w lukę cyklodekstryn,
- ◆  $\beta$ - cyklodekstryna tworzy trwalsze kompleksy z monoterpunami bicyklicznymi niż z monocyklicznymi a najłabsze kompleksy formuje z monoterpunami acyklicznymi,
- ◆  $\gamma$ -cyklodekstryna tworzy kilkakrotnie trwalsze kompleksy z trzema monoterpunami bicyklicznymi kamfenem,  $\beta$ - oraz  $\alpha$ -pinenem mającymi budowę bardziej “sferyczną” niż pozostałe związki w badanej grupie.

Przytoczone dane zostaną zanalizowane w rozdziale “Dyskusja i wnioski”.

### 7.3.2. Szacowanie stałych trwałości kompleksów monoterpénów z $\alpha$ -cyklodekstryną

W przypadku kompleksów badanych monoterpénów z  $\alpha$ -cyklodekstryną jak wykazano w niniejszej pracy, tworzą się kompleksy o stechiometrii 1:2. Z tego względu oszacowanie stałych trwałości jest nieco trudniejsze niż w przypadku gdy tworzą się kompleksy o stechiometrii 1:1. Z wzoru 6.9 przedstawiającego zależność czasów retencji od stężenia cyklodekstryny w przypadku kompleksów o stechiometrii 1:2 otrzymano zależność:

$$\frac{t_R - t_R^0}{t_R^0} = K_1[CD] + K_2[CD]^2 \quad \text{Równ. 7.1}$$

Z wykresów na rysunku 7.3 można wywnioskować, że w warunkach eksperymentu kompleksy o stechiometrii 1:1 nie powstają lub mają niską trwałość co pozwala na założenie, że  $K_1 \approx 0$ . Wtedy równanie upraszcza się do formy:

$$\frac{t_R - t_R^0}{t_R^0} = K_2[CD]^2 \quad \text{Równ. 7.2}$$

co po zlogarytmowaniu obu stron daje:

$$\ln \frac{t_R - t_R^0}{t_R^0} = \ln K_2 + 2 \ln[CD] \quad \text{Równ. 7.3}$$

Korzystając z danych retencyjnych przedstawionych na rys. 7.3 wykreślono zależność podaną równaniem 7.3. Otrzymane wartości  $K_2$  przedstawia tabela 7.4.

Tabela 7.4 Stałe trwałości kompleksów monoterpenu z  $\alpha$ -cyklodekstryną o stechiometrii 1:2 w formamidzie; temp. 40°C.

Nazwa związku	$K_2$ [m <sup>-2</sup> ]
(+)- $\alpha$ -pinen	104
(-)- $\alpha$ -pinen	327
(+)- $\beta$ -pinen	57
(-)- $\beta$ -pinen	156
(+)-kamfen	81
(-)-kamfen	273
(+)-limonen	35
(-)-limonen	22

Na podstawie wyników zamieszczonych w tabeli 7.4 można zauważyć, że:

- ♦ oprócz enancjomerów limonenu pozostałe związki tworzą stosunkowo trwałe kompleksy,

- ◆ różnice w stałych trwałości pomiędzy dwoma enancjomerami tego samego związku są znaczne; stałe trwałości  $K_2$  enancjomerów (-)- $\alpha$ -pinenu, (-)- $\beta$ -pinenu i (-)-kamfenu są około trzykrotnie większe niż stałe odpowiadających im (+)-enancjomerów.

## 8. Rola matrycy jako rozpuszczalnika naturalnych cyklodekstryn w przygotowaniu stereoselektywnych faz stacjonarnych

Zastosowanie formamidu jako rozpuszczalnika  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryn umożliwiło udowodnienie, że cyklodekstryny mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne nie tylko w wodzie lecz również w innych rozpuszczalnikach. Dzięki zastosowaniu tych roztworów w chromatografii gazowej jako ciekłych faz stacjonarnych rozdzielono szereg związków niskowrzących i o charakterze hydrofobowym.

Formamid ma jednak ograniczone zastosowanie ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne. Stosunkowo niska temperatura wrzenia (210°C) oraz jego duża polarność umożliwiają analizowanie głównie niższych węglowodorów. Pomimo uzyskiwania wysokich współczynników rozdzielania dla kolumn pakowanych, których fazy stacjonarne stanowiły formamidowe roztwory cyklodekstryn, ich sumaryczna efektywność nie jest wysoka w porównaniu z kolumnami kapilarnymi, które cechuje bardzo duża liczba póltek. Inną niedogodnością jest stosunkowo krótka trwałość użytkowania kolumn i fakt, że zastosowanie tego systemu do przygotowania kolumn kapilarnych okazało się niemożliwe.

Analizowanie węglowodorów o wyższej masie cząsteczkowej lub związków bardziej polarnych wymagało wprowadzenia nowego rozpuszczalnika-matrycy o wyższej temperaturze wrzenia i niższej polarności. Znalezienie takiego rozpuszczalnika nie było sprawą prostą z uwagi na nietypowe zachowanie się cyklodekstryn w różnych środowiskach.  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -Cyklodekstryny mimo, że różnią się jedynie liczbą jednostek glukozowych nie zachowują się jak cząsteczki stosunkowo podobne do siebie. Mimo wielu starań nie udało się znaleźć prawidłowości wiążących właściwości

fizykochemiczne cyklodekstryn z liczbą jednostek glukozowych, składających się na ich budowę. Nie można im przypisać cech homologów; wyjątek stanowią jedynie wymiary geometryczne. Odwrotnie, każda z cyklodekstryn stanowi odrębne indywiduum o zupełnie innych właściwościach fizykochemicznych. Wystarczy na przykład porównać rozpuszczalność cyklodekstryn w wodzie przytoczoną w rozdziale 3 lub właściwości kompleksowania różnych cząsteczek opisane w rozdziale 5.

W toku badań wielu różnych ciekłych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii gazowej, okazało się, że wymagania takiego rozpuszczalnika-matrycy do pewnego stopnia spełnia gliceryna.

Gliceryna różni się znacznie właściwościami fizykochemicznymi od formamidu o temperaturze wrzenia 210°C i stałej dielektrycznej 109,5, jej temperatura wrzenia jest wyższa i wynosi 290°C a stała dielektryczna niższa - 42,98 (w temp. 20°C).

Stwierdzono, że poszczególne cyklodekstryny różnią się rozpuszczalnością w formamidzie, glicerynie i dla porównania w wodzie, i tak:

- $\alpha$ -CD jest stosunkowo dobrze rozpuszczalna w wodzie lecz bardzo słabo rozpuszczalna w formamidzie i glicerynie,
- $\beta$ -CD jest bardzo dobrze rozpuszczalna w formamidzie podczas gdy jej rozpuszczalność w wodzie i glicerynie jest bardzo ograniczona,
- $\gamma$ -CD wykazuje umiarkowaną rozpuszczalność we wszystkich trzech rozpuszczalnikach.

W związku z tym do przygotowania glicerynowych kolumn z  $\alpha$ - i  $\beta$ -cyklodekstryną konieczne było użycie pomocniczych substancji umożliwiających rozpuszczenie żądanej ilości tych cyklodekstryn. W przypadku  $\alpha$ -cyklodekstryny zastosowano podobnie jak do kolumn formamidowych azotan litu ( $\text{LiNO}_3$ ), natomiast w przypadku

$\beta$ -cyklodekstryny wykorzystano mocznik, który według Hinze et al. zwiększa jej rozpuszczalność [89]. Chromatografia gazowa nie umożliwiła wyjaśnienia roli jaką pełnią azotan litu i mocznik. Na podstawie przeprowadzonych badań można jedynie sugerować, że obok wpływu na rozpuszczalność mogą one powodować zmiany strukturalne cząsteczek cyklodekstryn.

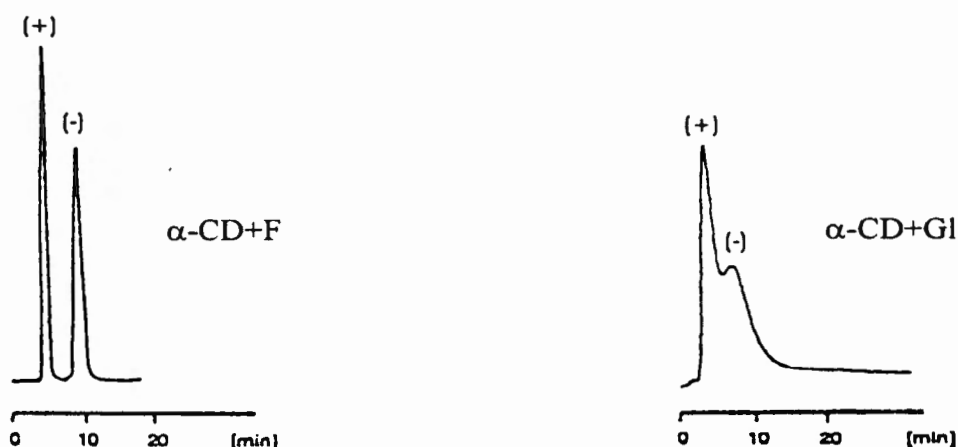
Kolumny z gliceryną okazały się bardziej trwałe w porównaniu z kolumnami formamidowymi. Pracowały w temperaturze 80-100°C przez około 400 godzin bez zmian wskazujących na ubytek gliceryny bądź zmniejszenie ich aktywności.

### *8.1. Porównanie chromatograficznych właściwości $\alpha$ -, $\beta$ - i $\gamma$ -cyklodekstryn rozpuszczonych w glicerynie i w formamidzie.*

Jako związki modelowe do porównania wybrano  $\alpha$ - i  $\beta$ -pineny. W poprzednich badaniach opisanych w rozdziale 5 stwierdzono, że  $\alpha$ -cyklodekstryna odznacza się wysoką stereoselektywnością wobec enancjomerów (+) i (-)- $\alpha$ -pinenu, natomiast  $\beta$ -cyklodekstryna jest wysoce stereoselektywna wobec izomerów konstytucyjnych  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenów.

Rys. 8.1 przedstawia rozdzielenie enancjomerów (+) i (-)- $\alpha$ -pinenu uzyskane na kolumnach odpowiednio z  $\alpha$ -cyklodekstryną rozpuszczoną w formamidzie i glicerynie.



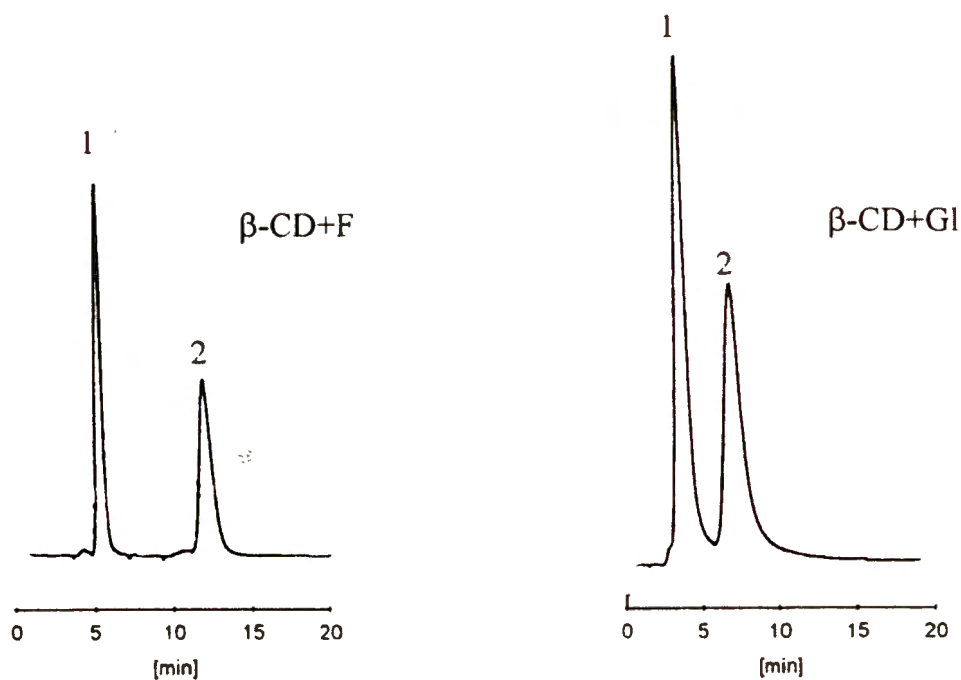


Rys. 8.1 Chromatogramy enancjomerów  $\alpha$ -pinenu uzyskane na kolumnach o wymiarach 2 m x 4 mm z  $\alpha$ -cyklodekstryną rozpuszczoną w formamidzie ( $\alpha$ -CD+F) i glicerynie ( $\alpha$ -CD+Gl); temp. 40°C, stężenie  $\alpha$ -cyklodekstryny - 0,16 m

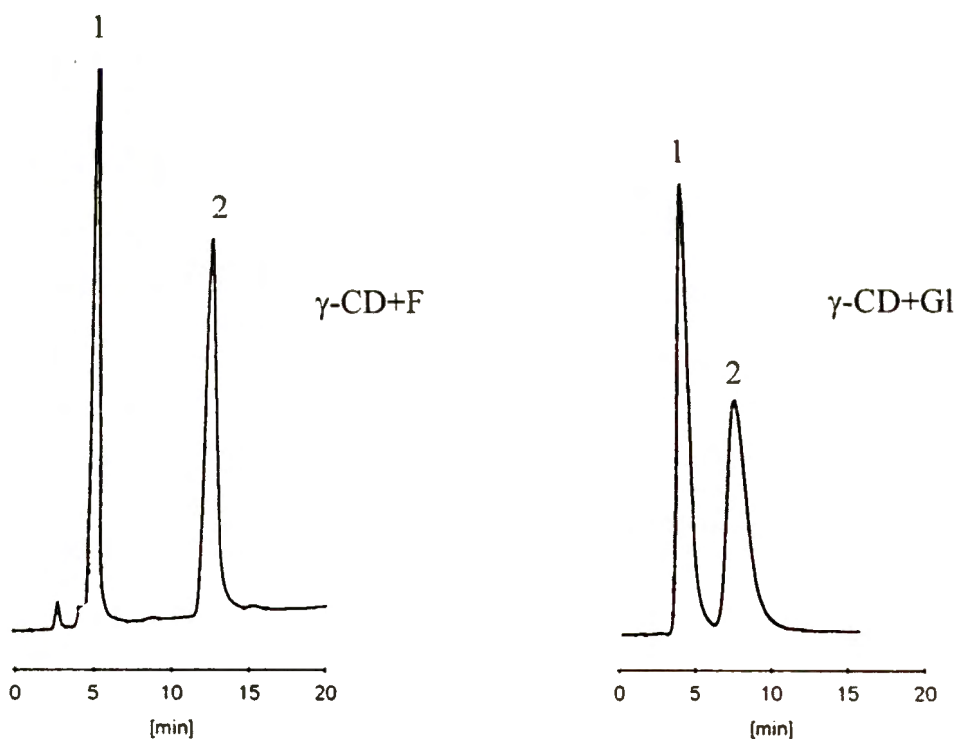
Można zauważyć, że współczynniki rozdzielania  $\alpha$  enancjomerów  $\alpha$ -pinenu ( $\alpha_{+/-} \approx 2$ ) są podobne natomiast czasy retencji na kolumnie glicerynowej są krótsze a efektywność czyli liczba póltek teoretycznych jest mniejsza niż w przypadku kolumny formamidowej.

Rys. 8.2 prezentuje rozdzielenie  $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów uzyskane na kolumnach z  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryną rozpuszczoną w formamidzie i glicerynie. Tutaj również współczynnik rozdzielania badanych izomerów jest podobny w obu przypadkach ( $\alpha \approx 2$ ), a czasy retencji uzyskane na kolumnie z gliceryną są około dwa razy krótsze niż na kolumnie z formamidem.

a)



b)



Rys. 8.2 Rozdzielenia mieszaniny  $\alpha$ -pinenu (1) i  $\beta$ -pinenu (2) uzyskane na kolumnach o wymiarach 2 m x 4 mm z formamidowym oraz glicerynowym roztworem  $\beta$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,08 m; temp. 60°C (a) oraz formamidowym i glicerynowym roztworem  $\gamma$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,08 m; temp. 50°C (b)

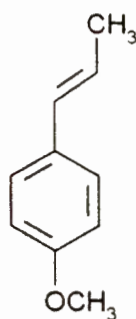
Na podstawie danych retencyjnych możemy ocenić, że trwałość kompleksów z cyklodekstrynami jest w przybliżeniu dwa razy mniejsza w glicerynie niż w formamidzie. Jest to zachowanie zgodne z teorią, która mówi, że stabilność kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstrynami powinna wzrastać ze wzrostem polarności rozpuszczalnika - matrycy.

## 8.2. Przykłady nowych rozdzielen w glicerynowych roztworach cyklodekstryn

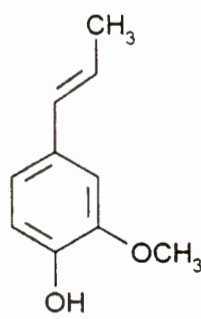
Zastosowanie glicerynowych roztworów cyklodekstryn jako stereoselektywnych faz stacjonarnych umożliwiło rozdzielanie wielu tlenowych pochodnych monoterpenu. Uzyskanie rozdzielen tych związków nie było możliwe w przypadku stosowania formamidu głównie ze względu na ograniczenia temperatury analizy kolumn formamidowych.

### 8.2.1. Rozdzielenia diastereoizomerów

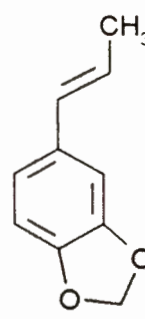
Rys. 8.3 przedstawia zależność współczynników rozdzielania -  $\alpha$  od stężenia  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryn uzyskanych dla trzech par diastereoizomerów: cis-trans-anelolu, cis-trans-izosafrolu i cis-trans-izoeugenolu.



anetol

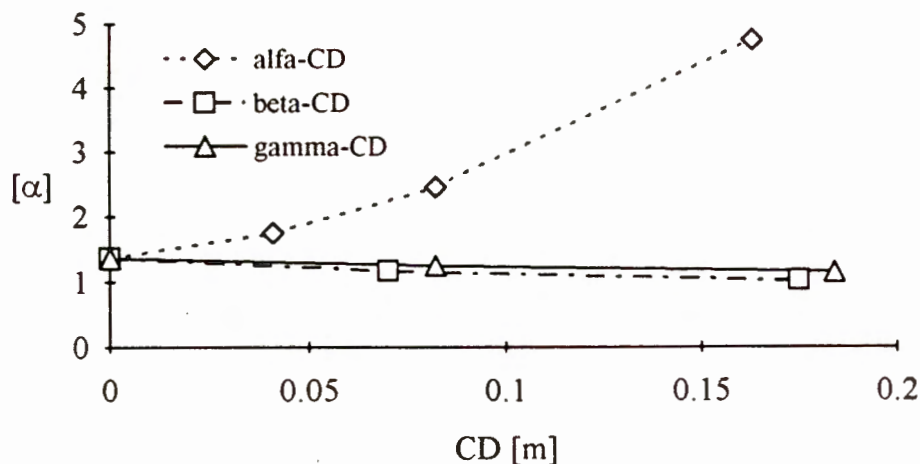


izoeugenol

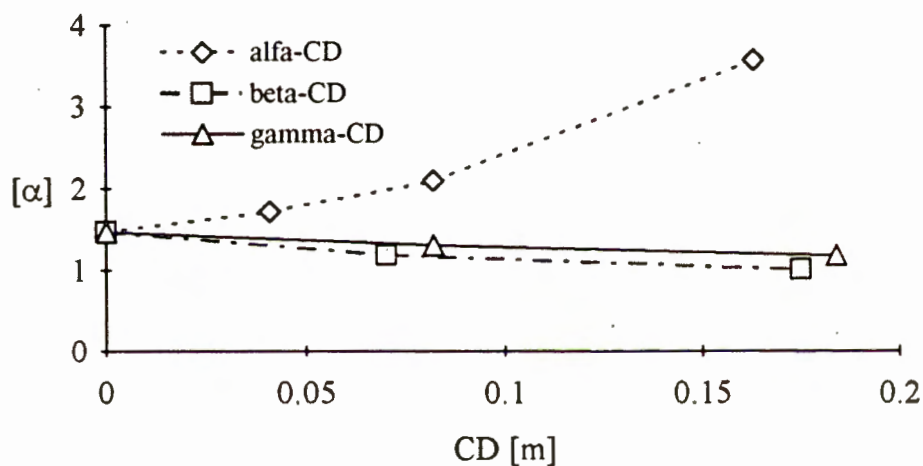


izosafrol

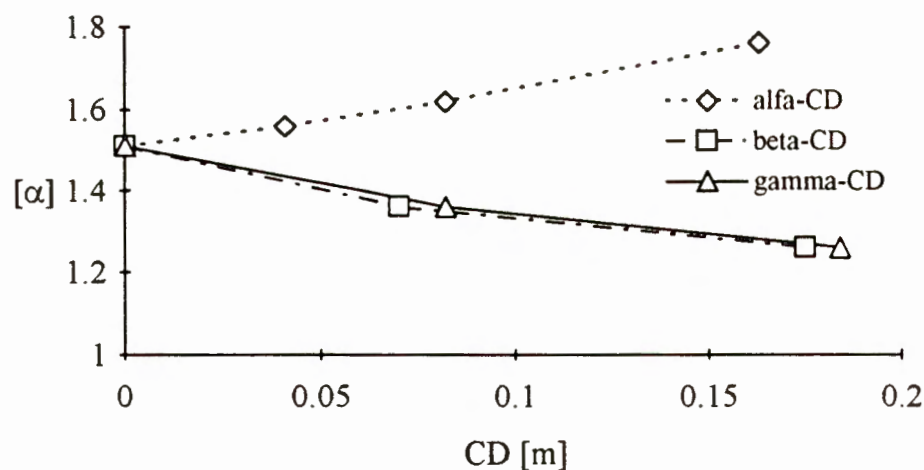
a)



b)



c)



Rys. 8.3 Zależność współczynnika rozdzielania  $\alpha$  od stężenia  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryn uzyskanych dla (a) cis-trans-anetolu, (b) cis-trans-izosafrolu, (c) cis-trans-izoeugenolu. Temperatura: (a) i (b) 80°C, (c) 100°C, przepływ gazu nośnego: 40 ml/min.

Na podstawie wyżej zaprezentowanych wykresów możemy zauważyć, że:

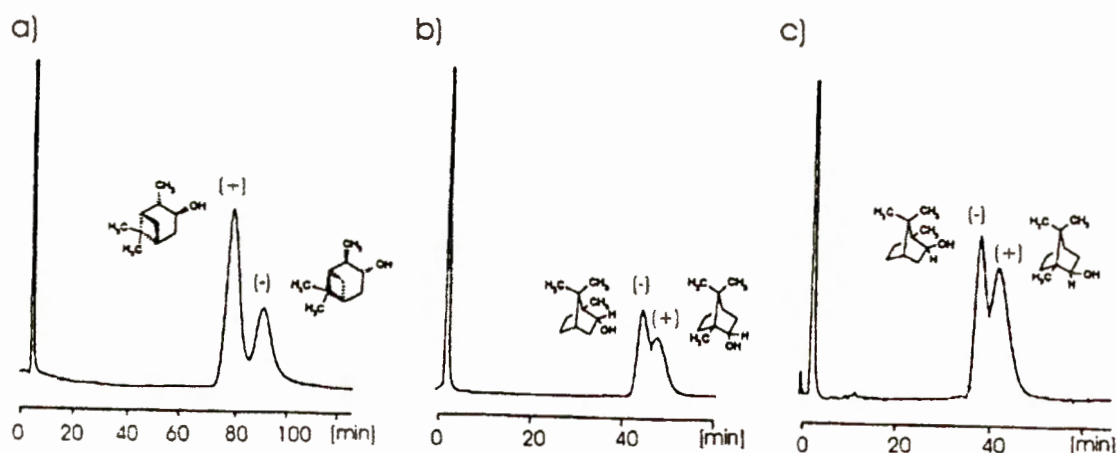
- ◆  $\alpha$ -cyklodekstryna odznacza się wybitną stereoselektywnością wobec diastereoizomerów cis-trans badanych substancji. Bardziej stabilne kompleksy tworzą się z izomerami trans. Kierunek stereoselektywności jest zgodny z otrzymanym na kolumnie matrycowej z czystą gliceryną ( $\alpha_{\text{trans-cis}} \approx 1,5$  dla matrycy). W przypadku anetolu i izosafrolu obserwuje się bardzo wysokie współczynniki rozdzielania -  $\alpha_{\text{trans-cis}} \approx 4$ .
- ◆  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryna zachowują się odmiennie. Ich stereoselektywność wobec badanych substancji jest umiarkowana a bardziej stabilne kompleksy tworzą się z izomerami cis. W rezultacie początkowa stereoselektywność uzyskana na matrycy zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryn - jeden proces jest znoszony przez drugi; w przypadku anetolu i izosafrolu ( $\alpha_{\text{trans-cis}} \approx 1$ ).
- ◆ Na podstawie tak podobnego zachowanie się badanych izomerów cis-trans w badanych warunkach, zwłaszcza w przypadku kolumn z  $\alpha$ -cyklodekstryną, można wnioskować, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za stereoselektywne rozpoznanie tych diastereoizomerów jest wniknięcie grupy  $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$  do wnętrza cyklodekstryny, bez względu na różnice w strukturze pozostałej części molekuly.
- ◆ Zależność pomiędzy współczynnikiem rozdzielania  $\alpha$  a stężeniem  $\alpha$ -cyklodekstryny w temp.  $80^\circ\text{C}$  jest wyraźnie nieliniowa. Może to świadczyć o tym, że przy wyższych stężeniach  $\alpha$ -cyklodekstryny oprócz kompleksów o stechiometrii 1:1 tworzą się również kompleksy o stechiometrii 2:1.

Zachowanie się izoeugenolu jest nieco odmienne prawdopodobnie z uwagi na wyższą o  $20^\circ\text{C}$  temperaturę analizy w porównaniu z temperaturą analizy anetolu i izosafrolu.

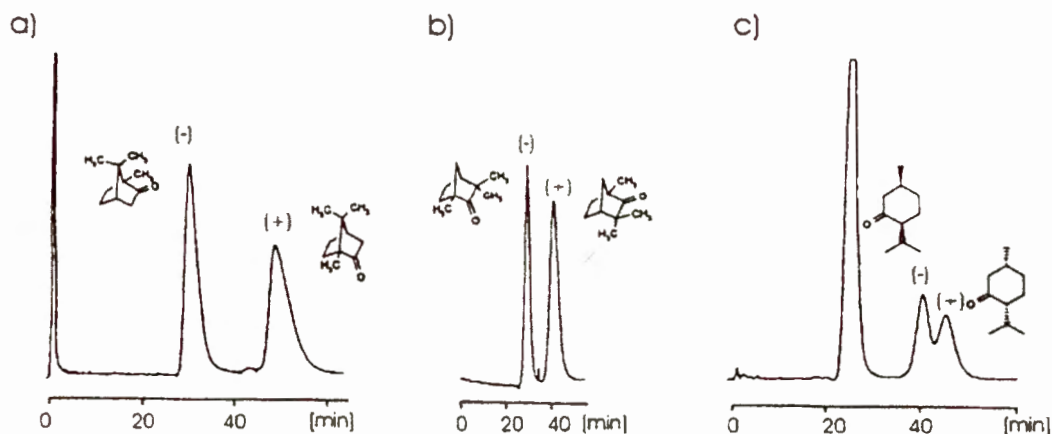
Temperatura ta została tak dobrana aby otrzymać względnie optymalne czasy retencji izoeugenolu. Pomimo tego, można zauważyć, że tendencje zaobserwowane dla anetolu i izosafrolu są również zachowane dla izoeugenolu.

### 8.2.2. Rozdzielenia enancjomerów

Rysunki 8.5 i 8.6 prezentują rozdzielania enancjomerów alkoholi i ketonów terpenowych uzyskane na kolumnach z glicerynowymi roztworami  $\alpha$ -cyklodekstryny. Podobnie jak w przypadku kolumn z formamidowymi roztworami cyklodekstryn również w przypadku rozpuszczalnika-gliceryny jedynie  $\alpha$ -cyklodekstryna posiada właściwości umożliwiające rozdzielania enancjomerów badanych związków terpenowych.



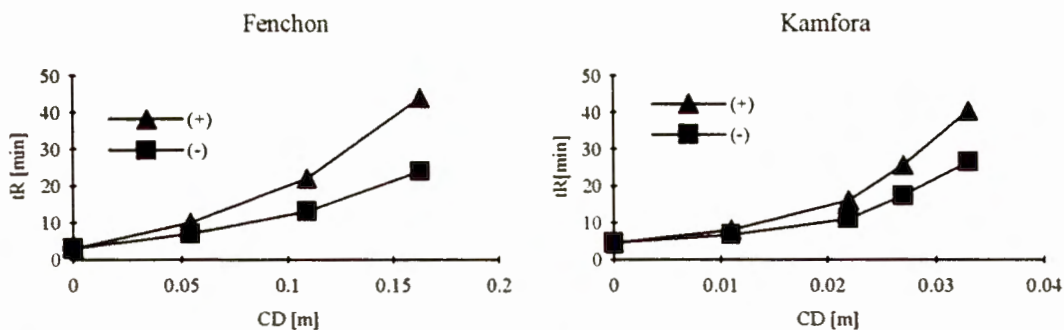
Rys. 8.4 Rozdzielenia enancjomerów alkoholi terpenowych uzyskane na kolumnach o wymiarach 2m x 4mm; (a) (+/-)-izopinokamfeol, temp. 80°C, stęż.  $\alpha$ -CD - 0,163 m, (b) (+/-)-borneol i (c) (+/-)-izoborneol, temp. 90°C, stęż.  $\alpha$ -CD - 0,041 m.

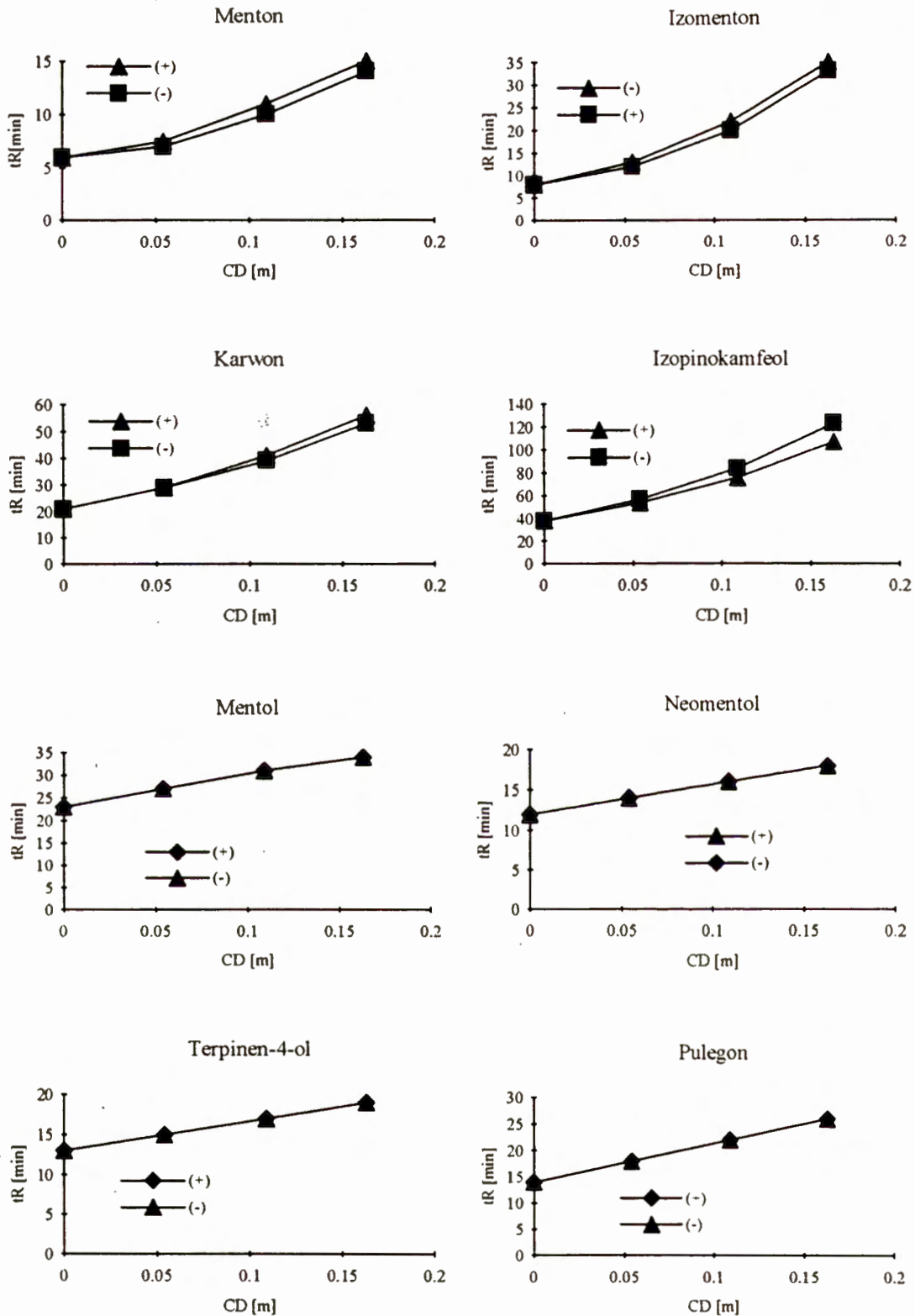


Rys. 8.5 Rozdzielenia enancjomerów ketonów monoterpenowych uzyskane na kolumnach o wymiarach 2m x 4mm; (a) (+/-)-kamfora; temp. 90°C, stęż.  $\alpha$ -CD - 0,041 m, (b) (+/-)-fenchon i (c) (+/-)-izomenton; temp. 60°C, stęż.  $\alpha$ -CD - 0,082 m.

### 8.2.3. Wpływ stężenia $\alpha$ -cyklodekstryny na rozdzielenie enancjomerów monoterpenoidów

Rys. 8.6 przedstawia zależność zredukowanych czasów retencji enancjomerów wybranych alkoholi i ketonów monoterpenowych od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny.





Rys. 8.6 Zależność zredukowanych czasów retencji enancjomerów: fenchonu, kamfory, mentonu, izomentonu, karwonu, izopinokamfeolu, mentolu, neomentolu, terpinen-4-olu i pulegonu od stężenia molalnego  $\alpha$ -cyklodekstryny; temp. 80°C, przepływ gazu nośnego 40 ml/min.



Można zaobserwować, że różnice w zachowaniu się poszczególnych monoterpenuoidów są duże:

- w przypadku mentolu, neomentolu, pulegonu i terpinen-4-olu zależność czasów retencji od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny jest liniowa w badanym zakresie stężeń i nie udało się w tych przypadkach uzyskać rozdzielania enancjomerów,
- w przypadku fenchonu, kamfory, mentonu, izomentonu, karwonu i izopinokamfeolu zależność ta jest kwadratowa, przebieg krzywych jest podobny do tych otrzymanych dla  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenów, kamfenu i limonenu opisanych w rozdziale 7, ponadto obserwujemy w tych przypadkach rozdzielanie enancjomerów,
- różnice w przebiegu zależności wskazują na odmienną tworzenie kompleksów inkluzyjnych, 1:1 w przypadku zależności liniowej i 2:1 w przypadku zależności kwadratowej.

Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że wysoka enancjoselektywność jaką uzyskujemy w przypadku stosowania roztworów  $\alpha$ -cyklodekstryny jest związana z tworzeniem przez nią kompleksów o stechiometrii 2:1 z rozdzielanymi enancjomerami monoterpenuoidów. Fenomen ten będzie dalej dyskutowany w rozdziale "Dyskusja i wnioski".

## 9. Układy imitujące chromatografię wielowymiarową

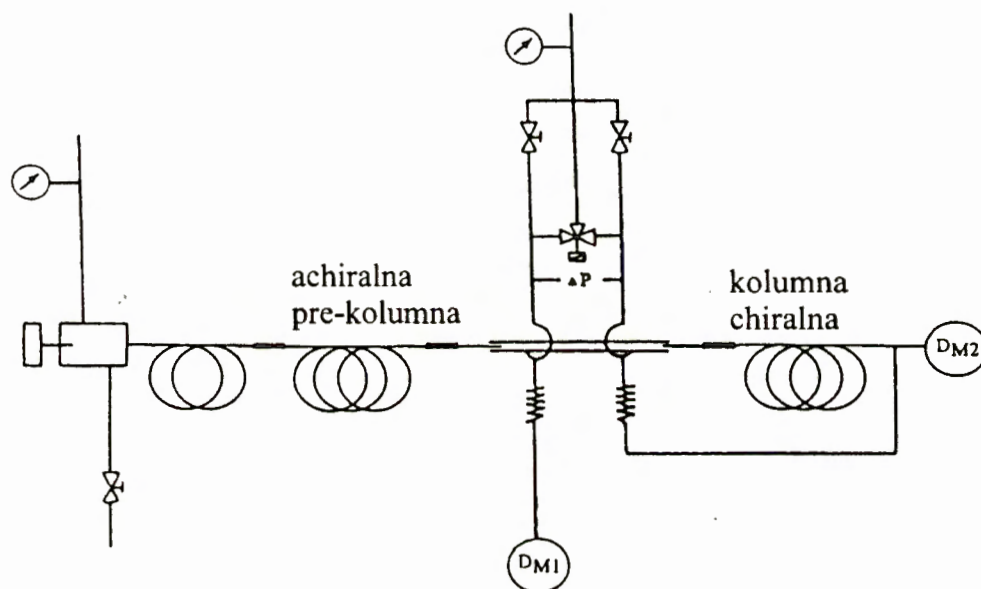
Rozdzielanie mieszanin związków terpenowych takich jak na przykład olejki eteryczne, zawierające różnego typu izomery, w tym enancjomery jest wciąż trudnym do rozwiązania problemem. W analizie chromatograficznej tych wieloskładnikowych mieszanin stosując nawet chiralne kolumny kapilarne zawierające pochodne cyklodekstryn trudno jest uniknąć nakładania się pików. W sytuacji gdy uzyskuje się rozdzielanie enancjomerów związków chiralnych, wiele innego rodzaju izomerów może pozostać nierozdzielone.

Obecnie do tego rodzaju rozdzielen często stosuje się tzw. wielowymiarową chromatografię gazową (w tych przypadkach zwaną też dwuwymiarową chromatografią gazową) [25, 90- 92].

*Zgodnie z klasyczną terminologią w chromatografii kolumnowej, rozdzielania nazywamy dwu- lub wielowymiarowymi wówczas gdy rozdzielanie całej próbki lub niektórych jej składników jest powtórzone na dwóch lub większej liczbie kolumn o różnej polarności i selektywności (zdolności rozdzielczej) połączonych szeregowo z kolumną na której uzyskano pierwsze rozdzielanie [93].*

Metoda ta wymaga specjalnej aparatury - chromatografu gazowego wyposażonego w dwa piece z oddzielnymi systemami ogrzewania z dwoma detektorami i zaworami umożliwiającymi połączenie kolumn znajdujących się w dwóch piecach. W systemie tym łączone są szeregowo dwie kolumny kapilarne: achiralna i chiralna. Mieszanina terpenów jest wstępnie rozdzielana na achiralnej kolumnie kapilarnej, następnie za pomocą zaworu odcinane są związki chiralne i kierowane pojedynczo do kolumny kapilarnej z cyklodekstrynami (rys. 9.1). Tu dopiero następuje rozdzielanie danej

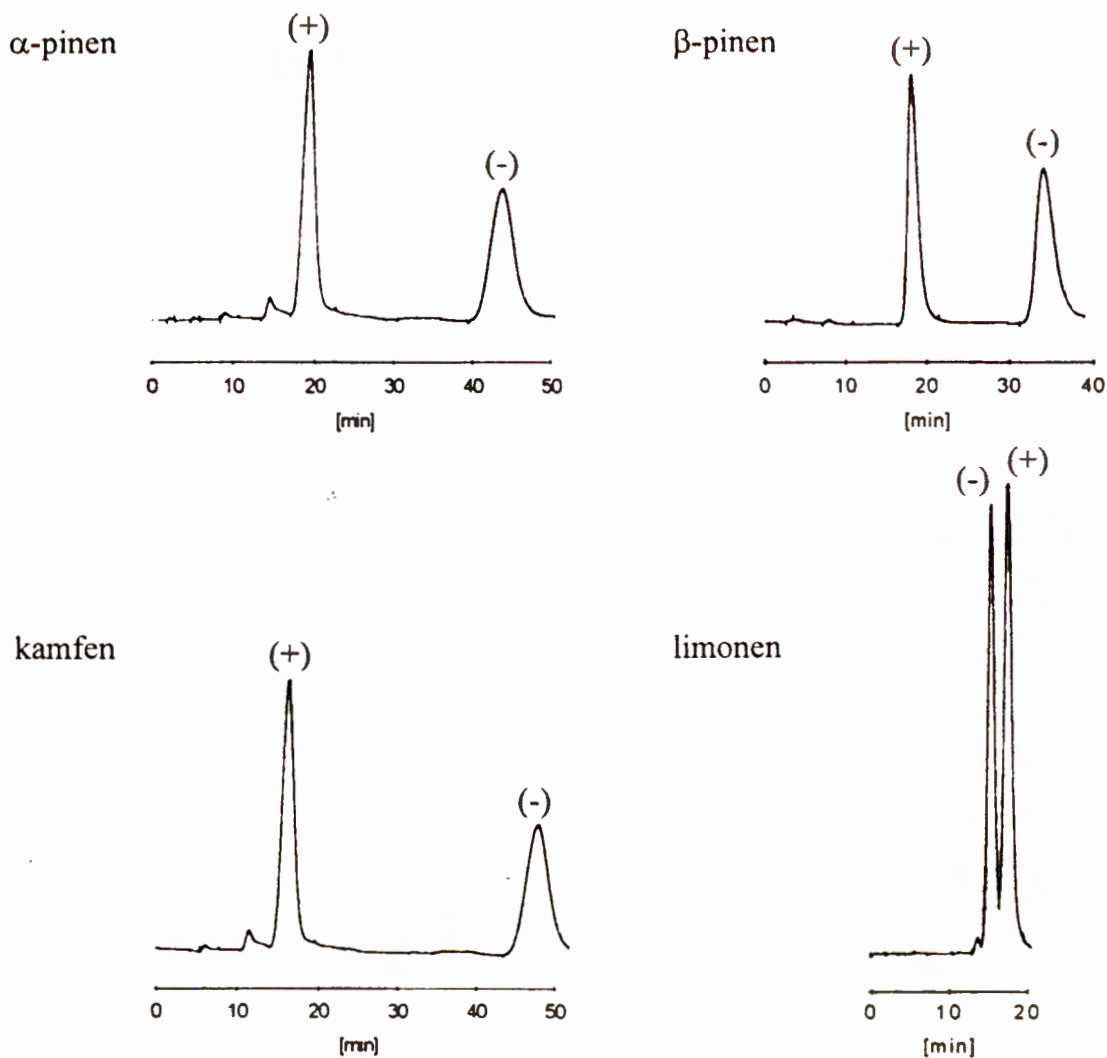
chiralnej substancji na enancjomery. Unika się w ten sposób nakładania się pików poszczególnych związków.



Rys. 9.1 Schemat enancjoselektywnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej;  $D_{M1}$ ,  $D_{M2}$  - detektory płomieniowo jonizacyjne [90].

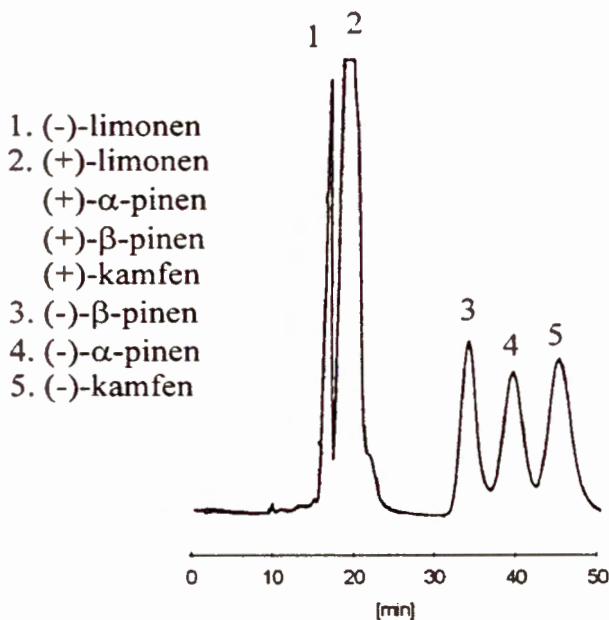
W naszym laboratorium ze względu na brak odpowiedniej aparatury zaprojektowano uproszczoną wersję tej metody.

Wyniki opisane w rozdziale 5 wykazały, że formamidowy roztwór  $\alpha$ -CD jest bardzo skutecznym selektorem dla enancjomerów węglowodorów terpenowych natomiast nie nadaje się do rozdzielania izomerów innego typu. Widać to na przykładzie rozdzielenia czterech modelowych monoterpenu:  $\alpha$  i  $\beta$ - pinenów, kamfenu i limonenu (rys. 9.2) - każdy z nich występuje w dwóch formach enancjomerycznych.



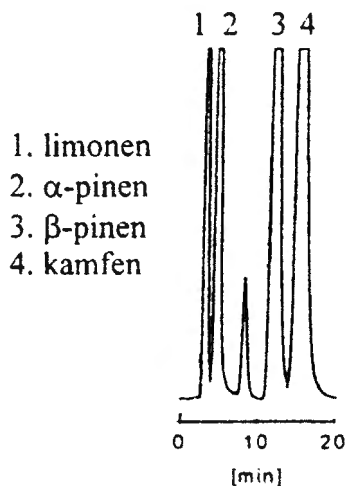
Rys. 9.2 Chromatogramy racemicznych mieszanin  $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, kamfenu i limonenu uzyskane na kolumnie o wymiarach 4 m x 4 mm z formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,15 m; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min.

Pojedynczo uzyskano bardzo dobre rozdzielanie każdej pary enancjomerów poza limonenem. Natomiast w sztucznie zrobionej mieszaninie tych związków zamiast spodziewanych 8 pików widocznych jest tylko 5: piki (+)-limonenu, (+)- $\alpha$ -pinenu, (+)- $\beta$ -pinenu i (+)-kamfenu nakładają się na siebie - rys. 9.3.



Rys. 9.3 Chromatogram mieszaniny enancjomerów  $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, kamfenu i limonenu uzyskany na kolumnie o wymiarach 4 m x 4 mm z formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny, warunki analizy jak na rysunku 9.2.

$\beta$  i  $\gamma$ -CD nie rozróżniają w tym systemie enancjomerów za to są efektywnymi selektorami izomerów konstytucyjnych. Rysunek 9.4 prezentuje rozdzielanie izomerów konstytucyjnych  $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, limonenu oraz kamfenu uzyskane na kolumnie z  $\gamma$ -cyklodekstryną. Można zauważyć, że mimo krótkiej jednometrowej kolumny, badane związki są dobrze rozdzielone.

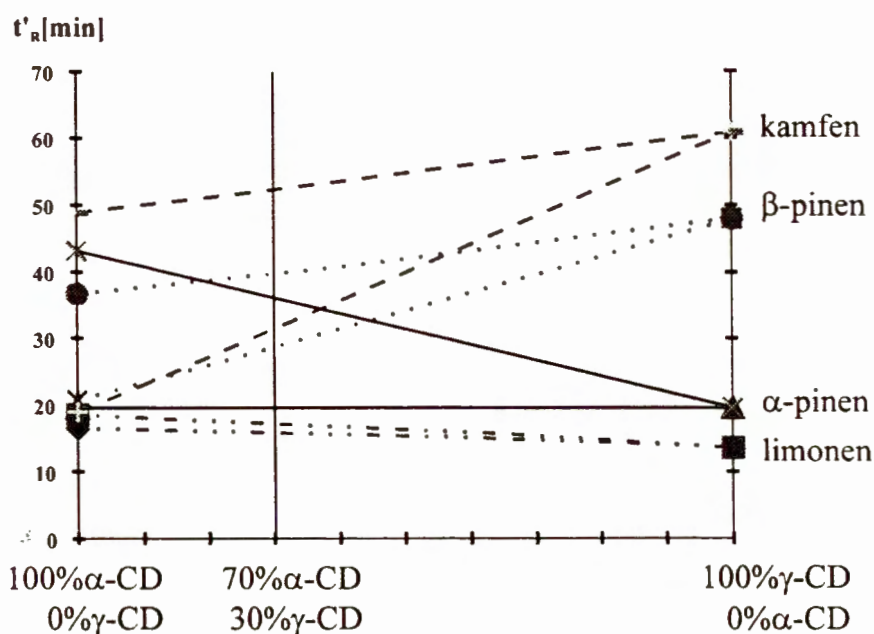


Rys. 9.4 Chromatogram mieszaniny izomerów uzyskany na kolumnie o wymiarach 1 m x 4 mm z formamidowym roztworem  $\gamma$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,14 m; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min.

Powstało pytanie: jak połączyć te dwa efekty nie dysponując odpowiednią aparaturą do chromatografii dwuwymiarowej?

Uzyskane wyniki umożliwiły opracowanie metody w której zastosowano dwie cyklodekstryny  $\alpha$  i  $\gamma$  jako składniki odpowiednich faz stacjonarnych umieszczonych szeregowo w jednej kolumnie chromatograficznej w celu zapewnienia jednoczesnego rozdzielania zarówno enancjomerów jak i izomerów konstytucyjnych wybranych monoterpénów.

Problem dobrania odpowiedniej ilości wypełnienia z  $\alpha$  i  $\gamma$ -CD tak aby uzyskać rozdzielanie wszystkich izomerów i enancjomerów badanych związków najłatwiej było rozwiązać graficznie. Rys. 9.5 przedstawia wykres w którym oś odciętych odpowiada długości kolumny chromatograficznej z odpowiednimi proporcjami wypełnienia z  $\alpha$  i  $\gamma$ -cyklodekstryną. Na osiach rzędnych odłożone są czasy retencji badanych związków ( $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, limonenu oraz kamfenu) uzyskane odpowiednio na kolumnie upakowanej wypełnieniem z  $\alpha$ -cyklodekstryną - z lewej strony oraz na takiej samej kolumnie upakowanej wypełnieniem z  $\gamma$ -cyklodekstryną z prawej strony.



Rys. 9.5 Wykres zależności czasów retencji enancjomerów  $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, limonenu oraz kamfenu od wzajemnych proporcji wypełnień z formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,15 m oraz  $\gamma$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,14 m.

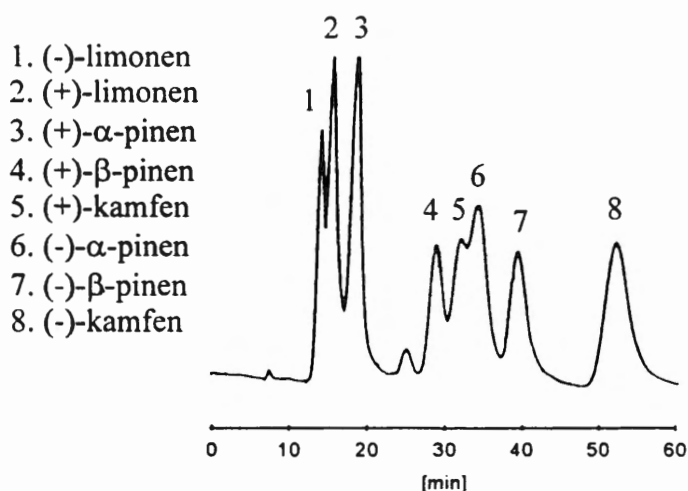
Zakładając addytywność czasów retencji połączono punkty odpowiadające tym samym związkom. Otrzymany wykres przedstawia teoretyczną zależność czasów retencji badanych terpenów od wzajemnych proporcji wypełnień z  $\alpha$ - oraz  $\gamma$ -cyklodekstryną. Można zauważyć, że proporcje wypełnień w którym badane związki powinny się najlepiej rozdzielić tzn. miejsce w którym czasy retencji tych związków możliwie różnią się od siebie odpowiada kolumnie upakowanej w przybliżeniu w 70% wypełnieniem z  $\alpha$ -cyklodekstryną i w 30% wypełnieniem z  $\gamma$ -cyklodekstryną.

### 9.1. Weryfikacja eksperymentalna metody

Według uzyskanych w ten sposób informacji została przygotowana kolumna, na której sprawdzono poprawność założeń.

Rysunek 9.6 przedstawia chromatogram modelowej mieszaniny enancjomerów monoterpenów uzyskany na kolumnie z  $\alpha$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryną. Można zaobserwować, że rozdzielenie uległo wyraźnej poprawie, na jednej kolumnie uzyskano rozdzielenie

zarówno enancjomerów jak i izomerów konstytucyjnych badanych terpenów. Czasy retencji poszczególnych związków są w przybliżeniu zgodne z wyznaczonymi na wykresie.



Rys. 9.6 Chromatogram sztucznej mieszaniny terpenów uzyskany na kolumnie o wymiarach 4 m x 4 mm wypełnionej: w 70% chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,15 m i w 30% chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\gamma$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,14 m; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min.

W przedstawiony powyżej sposób dysponując danymi retencyjnymi monoterpenów dla wypełnień z poszczególnymi cyklodekstrynami można zaprojektować układ chromatograficzny umożliwiający rozdzielenie izomerów wybranej grupy terpenów regulując stężeniem i rodzajem cyklodekstryń oraz proporcjami poszczególnych wypełnień.



## **10. Praktyczne zastosowanie faz stacjonarnych zawierających cyklodekstryny**

Opracowane metody chromatografii gazowej dotyczące rozdzielania izomerów związków monoterpenowych za pomocą cyklodekstryn zostały praktycznie wykorzystane:

- ⇒ do badania czystości enancjomerycznej wzorców terpenów,
- ⇒ do mikropreparatywnych rozdzieleń enancjomerów monoterpenów,
- ⇒ do analizy składu enancjomerycznego olejków eterycznych drzew iglastych,
- ⇒ do zbadania składu enancjomerycznego leków zawierających w swoim składzie związki terpenowe.

### **10.1. Chromatograficzna analiza czystości enancjomerycznej komercyjnych próbek kamfenu**

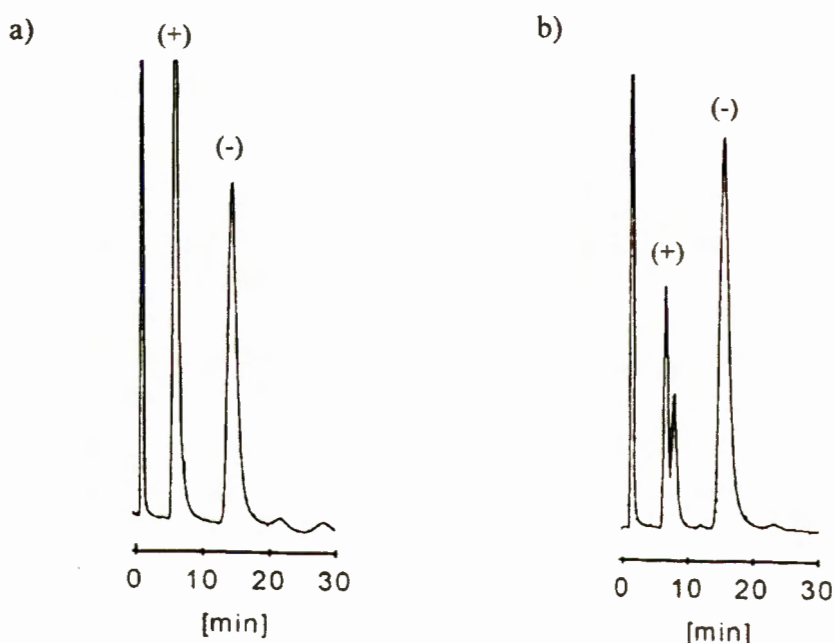
Większość dostępnych handlowo terpenów otrzymywana jest z surowców roślinnych, co przy dużej różnorodności produkowanych przez naturę izomerów tych związków powoduje trudności w izolacji pojedynczych czystych substancji. Trudności te są potęgowane gdy chodzi o otrzymanie enancjomerycznie czystych wzorców terpenowych. Rośliny na ogół nie wytwarzają pojedynczych enancjomerów danych terpenów, jest to zazwyczaj mieszanina obu enancjomerów o różnych proporcjach. Dlatego tak istotna przy produkcji terpenów jest kontrola analityczna składu enancjomerycznego zarówno substratów jak i produktów.

Jako przykład do sprawdzenia czystości enancjomerycznej wybrano kamfen. Analizie składu enancjomerycznego zostały poddane próbki kamfenu oferowane w sprzedaży przez różnych producentów o różnej deklarowanej czystości.

Do badań tych wykorzystano kolumnę wypełnioną chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,15 m.

Przykładowy chromatogram rozdzielania enancjomerów kamfenu przedstawia rys.

10.1

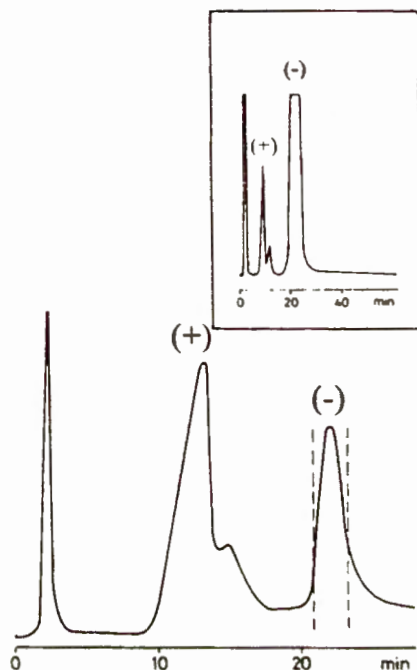


Rys. 10.1 Chromatogramy (+)-kamfenu firmy Merck (a) i (-)-kamfenu firmy Aldrich (b) uzyskane na kolumnie o wymiarach 2m x 4mm wypełnionej chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,15 m; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min

Aby sprawdzić kolejność wmywania enancjomerów kamfenu z kolumny z  $\alpha$ -cyklodekstryną przeprowadzono mikropreparatywny rozdział enancjomerów kamfenu.

Rys. 10.2 przedstawia chromatogram mikropreparatywnego rozdzielania około 10  $\mu$ l

kamfenu firmy Fluka rozpuszczonego w heptanie. Górny chromatogram przedstawia analityczny rozdział zebranej frakcji kamfenu.



Rys. 10.2 Chromatogram mikropreparatywny (+)-kamfenu firmy Aldrich otrzymany na kolumnie preparatywnej o wymiarach 8 m x 1 cm wypełnionej Chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,15 m; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min. Chromatogram górny przedstawia analityczny rozdział zebranej frakcji (-)-kamfenu, warunki analizy jak na rysunku 10.1.

Uzyskano niewielkie ilości obu enancjomerów. Określono chromatograficznie ich czystość optyczną oraz zmierzono skręcalność optyczną. Skręcalność optyczna enancjomeru wymywanego jako pierwszy wynosiła  $[\alpha]_D^{20} = +7,8^\circ$  a jego czystość optyczna wynosiła 82%, enancjomer wymywany jako drugi miał skręcalność optyczną równą  $[\alpha]_D^{20} = -8,5^\circ$  oraz czystość optyczną 94%. Można było stąd wywnioskować, że enancjomer wymywany jako pierwszy to (+)-kamfen, jako drugi wymywany jest (-)-kamfen. Dodatkowe analizy widm  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  NMR obu próbek potwierdziły te przypuszczenia.

Uzyskane wyniki czystości optycznej badanych próbek kamfenu przedstawia tabela

10.1.

Tabela 10.1 Zawartość procentowa (+) oraz (-)-kamfenu w próbkach różnych producentów

Nazwa związku	Nazwa producenta	Deklarowana czystość (%)	(+)-kamfen (%)	(-)-kamfen (%)
(+)-kamfen	Merck	95	52	44
(+)-kamfen	Fluka	90-95	33	54
(+)-kamfen	Aldrich	80	53	43
(-)-kamfen	Aldrich	85	18	68
kamfen	Janssen	95	28	56
kamfen	Chemipan	brak danych	56	31
kamfen	S.C.M. Glidco	brak danych	41	43

Można zaobserwować, że skład enancjomeryczny przebadanych próbek (+)-kamfenu jest bliższy racematowi niż (+)-kamfenowi a w przypadku (+)-kamfenu Fluki, w próbce w rzeczywistości przeważa (-) nad (+)-kamfenem. Próbka (-)-kamfenu firmy Aldrich również jest "zanieczyszczona" prawie w 20% (+)-kamfenem.

Producenci oferujący próbki (+) i (-)-kamfenu podając czystość związku odnoszą się jedynie do zanieczyszczeń kamfenu innymi substancjami, natomiast nie podają zawartości drugiego enancjomeru mimo, że w tych przypadkach on również stanowi zanieczyszczenie. Zanieczyszczenie jednego enancjomeru jego optycznym antypodem pozostaje nieznane, nie ma żadnej informacji o jego czystości enancjomerycznej.

Na podstawie tych przykładów można wnioskować o braku prawidłowej kontroli analitycznej umożliwiającej podanie rzeczywistej czystości enancjomerycznej sprzedawanych związków. Przedstawione wyniki zostały opublikowane [94].

## 10.2. Analiza składu enancjomerycznego leków zawierających w swoim składzie związku terpenowe

Sztuczne mieszaniny terpenów (mentolu, mentonu,  $\alpha$  i  $\beta$ -pinenów, borneolu, kamfenu i cyneolu) rozpuszczone w oliwie mają właściwości żółciotwórcze, rozkurczowe i bakteriostatyczne i są używane jako niedrogie preparaty w leczeniu kamieni żółciowych w przypadku kamicy żółciowej [95] i kamicy nerkowej [96]. Mechanizm za pomocą którego mieszanina terpenów hamuje tworzenie się kryształów cholesterolu w żółci nie jest dokładnie zbadany, stwierdzono jednak, że mentol i inne terpeny hamują aktywność acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej w ludzkim osoczu oraz reduktazy (S)-3-hydroksy-3-metylglutarylo-CoA, w rezultacie prowadzi to do zahamowania syntezy związków sterolowych w wątrobie.

Oddziaływanie terpenów na enzymy wskazuje na to, że skład enancjomeryczny leków których substancjami czynnymi są terpeny może mieć istotny wpływ na właściwości terapeutyczne takiego leku. Stwierdzono, że istnieją różnice w bioaktywności pomiędzy enancjomerami limonenu [97] i  $\alpha$ -pinenu [98]. Pomimo to w dostępnych handlowo lekach terpenowych, skład enancjomeryczny poszczególnych składników nie jest deklarowany i faktycznie nie jest znany.

Anlizie składu enancjomerycznego poddano następujące leki:

⇒ Rowachol (Rowa-Wagner, Niemcy)

⇒ Terpichol (Herbapol, Polska)

⇒ Rowatinex (Rowa-Wagner, Niemcy)

⇒ Terpinex (Herbapol, Polska) - obecnie wycofany z produkcji

⇒ Uroterp (Krka, Słowenia)

Mieszanki terpenów używane jako leki mają zasadniczo dwa różne składy chemiczne. Do leczenia kamicy żółciowej oraz w stanach zapalnych pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych stosowana jest mieszanina bogata w mentol oraz pineny i sprzedawana pod nazwą Rowachol i Terpichol. W mieszaninach stosowanych w kamicy nerkowej - Rowatinex, Uroterp i Terpinex dominującymi składnikami są pineny i kamfen. Deklarowany przez producentów skład leków przedstawiają tabele 10.2 i 10.3.

Tabela 10.2 Deklarowany skład procentowy terpenów wchodzących w skład Terpicholu i Rowacholu

Nazwa związku	Terpichol (%)	Rowachol (%)
$\alpha$ -pinen	20	20
$\beta$ -pinen	5	5
kamfen	8	8
cyneol	3	3
menton	9	9
borneol	8	8
mentol	48	48

Tabela 10.3 Deklarowany skład procentowy terpenów wchodzących w skład Terpinexu, Rowatinexu i Uroterpu

Nazwa związku	Terpinex	Rowatinex	Uroterp
$\alpha$ -pinen	46,2	37	44
$\beta$ -pinen		9	
kamfen	22,4	22	10
cyneol	4,5	4	14
fenchon	6	6	5,1
borneol	15	15	14
anetol	6	6	12,1

Można zauważyć, że w przypadku Terpicholu i Rowacholu deklarowany przez producentów skład leków jest identyczny a w przypadku Terpinexu, Rowatinexu i Uroterpu bardzo zbliżony. W żadnym z leków producent nie podaje składu enancjomerycznego poszczególnych składników.

### 10.2.1. Ocena poprawności metody analitycznej

Powtarzalność opracowanej metody chromatograficznej, zastosowanej do analizy leków sprawdzono analizując sztuczną mieszaninę następujących monoterpenów: (+)- $\alpha$ -pinenu, (-)- $\alpha$ -pinenu, (+)- $\beta$ -pinenu, (-)- $\beta$ -pinenu, (+)-kamfenu, (-)-kamfenu, (+)-limonenu oraz (-)-limonenu. Otrzymane rezultaty oceny statystycznej przedstawiają tabele 10.4 i 10.5.

Tabela 10.4 Powtarzalność metody analitycznej

Nr próbki	Stężenie							
	(+)- $\alpha$ -pinen	(-)- $\alpha$ -pinen	(+)- $\beta$ -pinen	(-)- $\beta$ -pinen	(+)-limonen	(-)-limonen	(+)-kamfen	(-)-kamfen
1	14,20	13,37	1,16	12,78	15,04	11,72	15,88	15,51
2	14,87	13,25	1,13	12,30	13,35	10,73	16,60	17,77
3	14,58	13,04	1,11	12,19	15,93	12,69	14,04	15,38
4	15,21	13,26	1,78	13,24	14,39	10,94	15,03	15,80
5	14,60	13,26	1,44	12,96	14,25	10,57	16,93	17,33
6	14,97	13,12	1,52	13,02	14,75	10,60	15,12	16,80
średnia	14,74	13,22	1,36	12,75	14,62	11,21	15,60	16,43
OS*	0,323	0,107	0,246	0,382	0,787	0,768	0,986	0,921
WOS**	2,2	0,8	18,1	3,0	5,4	6,9	6,3	5,6

OS - odchylenie standardowe

WOS - względne odchylenie standardowe

Względne odchylenie standardowe w przypadku badania stężenia poszczególnych składników próbki jest we wszystkich przypadkach mniejsze niż 10%. Jedynym

wyjątkiem jest (+)- $\beta$ -pinen, którego stężenie w analizowanej mieszaninie było bardzo niskie.

Tabela 10.5 Ocena statystyczna współczynnika selektywności

Nr próbki	$\alpha_{(+)(-)}$			
	$\alpha$ -pinen	$\beta$ -pinen	limonen	kamfen
1	2,16	1,49	1,11	2,73
2	2,04	1,41	1,09	2,46
3	2,31	1,46	1,10	2,50
4	2,10	1,46	1,10	2,60
5	2,21	1,49	1,11	2,48
6	2,15	1,45	1,11	2,56
średnia	2,16	1,46	1,10	2,56
OS	0,085	0,027	0,007	0,092
WOS	3,9	1,8	0,6	3,6

W przypadku oceny statystycznej współczynnika enancjoselektywności  $\alpha$  można zauważyć, że względne odchylenie standardowe jest we wszystkich przypadkach mniejsze niż 4%.

Przedstawione dane pozwalają stwierdzić, że zastosowana metoda chromatograficzna nadaje się do badania składu enancjomerycznego monoterpenów w lekach.

Korzystając z opracowanej metody do chromatograficznego rozdzielania enancjomerów węglowodorów terpenowych zbadano skład frakcji monoterpenowej w wybranych lekach. Tabela 10.6 przedstawia procentową zawartość enancjomerów poszczególnych monoterpenów w badanych preparatach.



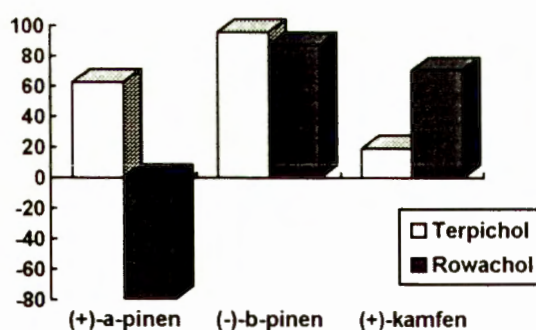
Tabela 10.6 Skład enancjomeryczny frakcji monoterpenowej w badanych lekach

Nazwa związku	Terpichol	Rowachol	Terpinex	Rowatinex	Uroterp
(+)- $\alpha$ -pinen	59,6	7,0	38,3	6,0	33,3
(-)- $\alpha$ -pinen	13,6	60,0	4,0	47,6	18,8
(+)- $\beta$ -pinen	0,1	1,0	1,5	1,0	0,0
(-)- $\beta$ -pinen	4,7	14,8	1,5	12,6	5,3
(+)-kamfen	10,5	12,8	25,6	17,7	7,3
(-)-kamfen	7,1	2,2	20,7	14,8	8,6

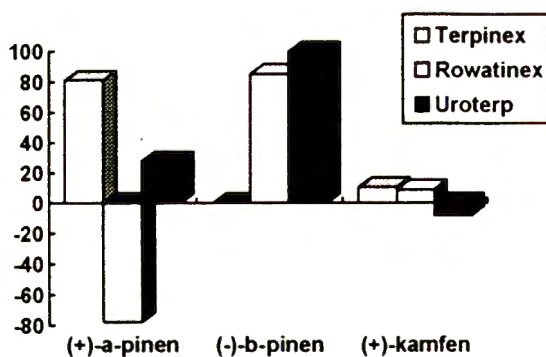
Określając wzajemne proporcje dwu enancjomerów tej samej substancji często używaną wielkością jest tak zwany *nadmiar enancjomeryczny* - EE (enantiomeric excess). Jest to stosunek różnicy zawartości dwóch enancjomerów do sumy ich zawartości.

$$EE(\%) = \frac{(R) - (S)}{(R) + (S)} \cdot 100$$

Równ. 10.1



Rys. 10.3 Nadmiar enancjomeryczny (+)- $\alpha$ -pinenu, (-)- $\beta$ -pinenu i (+)-kamfenu w Terpicholu i Rowacholu



Rys. 10.4 Nadmiar enancjomeryczny (+)- $\alpha$ -pinenu, (-)- $\beta$ -pinenu i (+)-kamfenu w Terpinexie, Rowatinexie i Uroterpie

Na podstawie powyższej tabeli i rysunków można zauważyć, że:

- ◆ główny składnik frakcji monoterpenej leków -  $\alpha$ -pinen występuje w Terpicholu i Terpinexie w przeważającej ilości w formie (+) natomiast w Rowacholu i Rowatinexie znacznie przeważa forma (-). W Uroterpie w niewielkim stopniu przeważa (+) nad (-)-pinenem,
- ◆  $\beta$ -pinen we wszystkich lekach poza Terpinexem w przeważającej ilości występuje w formie (-); w Terpinexie  $\beta$ -pinen występuje w postaci racemicznej,
- ◆ w Rowacholu dominującą formą kamfenu jest forma (+); w pozostałych lekach kamfen jest bliski racematowi jednak (poza Uroterpem) również w niewielkim stopniu przeważa forma (+).

Powyższe rezultaty wykazują znaczne różnice składu enancjomerycznego badanych leków, mimo że deklarowany przez producentów podobny skład leków sugeruje, że są one swoimi odpowiednikami. Świadczy to o braku standaryzacji składu enancjomerycznego leków, mimo iż wiadomo, że dwa enancjomery chiralnego związku mogą mieć różny wpływ na organizm człowieka.

Omówione rezultaty badań zostały opublikowane [99].

### 10.3. Skład enancjomeryczny węglowodorów monoterpenowych w olejkach eterycznych z jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)

Skład enancjomeryczny wybranych monoterpenów w olejkach eterycznych jest przedmiotem wielu badań. Z dotychczasowego niezbyt obszernego piśmiennictwa wynika, że skład izomerów i enancjomerów zależy nie tylko od gatunku rośliny ale także od innych niewyjaśnionych jeszcze dokładnie parametrów (fitosocjologicznych, ekobotanicznych, atmosferycznych, edaficznych, itp.)

Z drugiej strony skład ten może mieć znaczny wpływ na właściwości farmakologiczne i organoleptyczne olejków z jałowca, które są powszechnie stosowane w różnych formach leków oraz w środkach spożywczych.

Skład chemiczny (ale nie enancjomeryczny) olejków eterycznych z szyszkojagód oraz igieł jałowca był badany przez wielu autorów [100-102].

Opublikowane przez nas wyniki wstępnych badań nad składem enancjomerycznym lotnych związków terpenowych w komercyjnych olejkach eterycznych z jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) wykazały, że istnieją duże różnice w ich składzie w zależności od pochodzenia surowca [103]. Podjęto dalsze badania których celem była próba wyjaśnienia wpływu miejsca pochodzenia surowca, terminu jego zbioru oraz morfologicznej części rośliny na skład enancjomeryczny olejków eterycznych. Materiałem do badań analitycznych były olejki eteryczne uzyskane w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych z jałowca pospolitego, zebranego z różnych siedlisk na terenie Polski. Tabela 10.7 opisuje miejsca zbioru próbek jałowca.

Tabela 10.7 Miejsca i termin zbioru badanych próbek jałowca pospolitego

Próbka	Miejsce zbioru	Termin zbioru	Otoczenie próbki
A	Piechowice k. Gdańska	A1- Październik 1994 szyszkojagody zielone A-2- Marzec 1995 szyszkojagody czarne	las mieszany, sosna, brzoza, olsza
B	Węgorzewo	Październik 1994	las sosnowy
C	Mława	Październik 1994	skraj lasu mieszanego
D <sub>1</sub>	Kampinoski P.N. Rezerwat ścisły "Niepust"	Październik 1995	bagno porośnięte w 30% olszą, brzozą i sosną
D <sub>2</sub>	Kampinoski P.N. Młody las	Październik 1995	las sosnowy, pojedynczo brzoza, dąb, osika
E	Świdno k. Mogielnicy	Październik 1994	skraj lasu mieszanego, brzoza i sosna
F	Barreme (Francja)	Październik 1995	kruszyna, jarzębina

Wszystkie próbki jałowca były zebrane z osobników dojrzałych, zdrowych i tworzących formy krzewiaste. Olejki eteryczne otrzymano metodą destylacji z parą wodną ze świeżo rozdrobnionych szyszkojagód, igieł i drewna jałowca.

Otrzymane olejki poddano analizie chromatograficznej. Ponieważ jak wspomniano w części literaturowej olejki eteryczne stanowią skomplikowane mieszaniny zawierające do kilkudziesięciu związków terpenowych wstępnie zbadano achiralny skład olejków używając komercyjnej kolumny kapilarnej. Umożliwiło to zidentyfikowanie i określenie

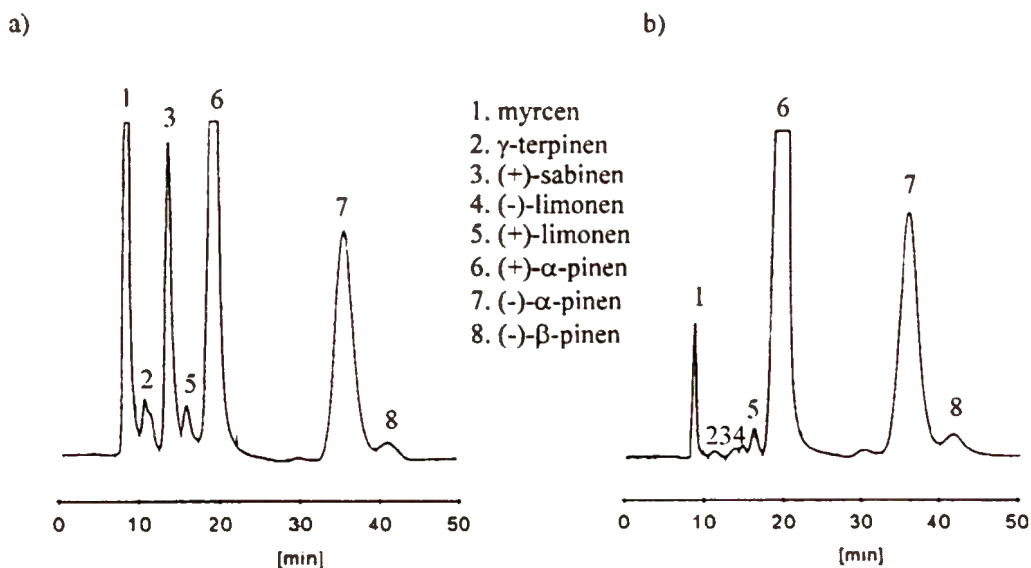
składu procentowego poszczególnych składników olejku (bez rozróżnienia chiralnego). Następnie zbadano skład enancjomeryczny frakcji monoterpenowej - stanowiącej w olejkach jałowcowych ok. 80% całego olejku. Zastosowano w tym celu kolumnę opracowaną w rozdziale 9, zawierającą dwa wypełnienia połączone szeregowo - 70% wypełnienia z  $\alpha$ -cyklodekstryną (do rozdzielania enancjomerów) i 30% wypełnienia z  $\gamma$ -cyklodekstryną (do rozdzielania izomerów konstytucyjnych).

Rys. 10.5 przedstawia przykładowe chromatogramy olejków eterycznych z igieł i szyszkojagód jałowca otrzymane na kolumnie z  $\alpha$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryną.

Porównano następnie rezultaty otrzymane z obu kolumn w celu uniknięcia pomyłki w przypadku nakładania się niektórych pików. Skład procentowy poszczególnych składników chiralnych i achiralnych przedstawiony jest w tabeli 10.8.

Mozemy zauważyć istotne różnice w składzie procentowym badanych olejków pomiędzy osobnikami jak również pomiędzy częściami morfologicznymi tego samego osobnika.

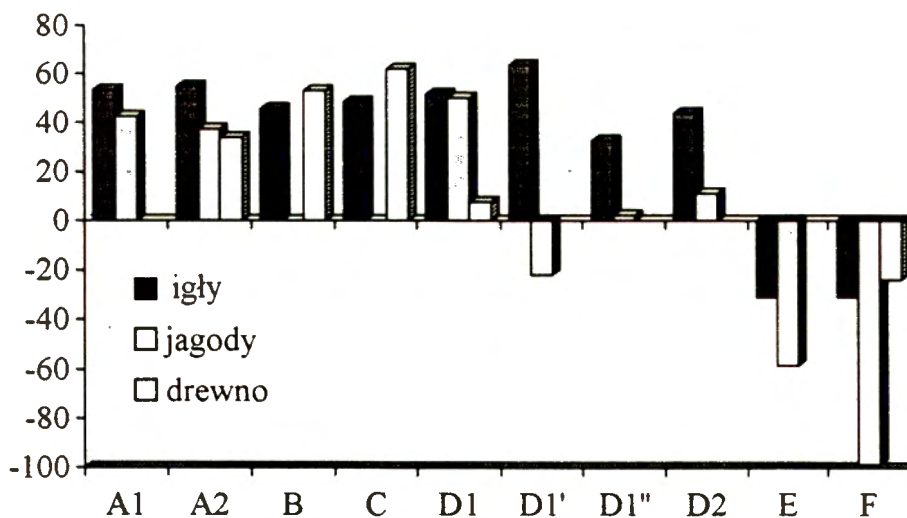
Z chiralnych składników badanych olejków  $\beta$ -pinen i sabinen występują tylko w jednej formie enancjomerycznej:  $\beta$ -pinen w formie (+) a sabinen w formie (-). Z powodu braku odpowiednich wzorców nie określono formy występującego w olejkach  $\beta$ -felandrenu.



Rys. 10.5 Chromatogram olejków eterycznych z szyszkojagód (a) oraz igieł (b) jałowca uzyskany na kolumnie o wymiarach 4 m x 4 mm wypełnionej: w 70% chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\alpha$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,15 m i w 30% chromosorbem pokrytym formamidowym roztworem  $\gamma$ -cyklodekstryny o stężeniu 0,14 m; temp. 40°C, przepływ gazu nośnego - 40 ml/min.

Największe zróżnicowanie znaleziono w składzie enancjomerycznym  $\alpha$ -pinenu. Rys.

10.6 przedstawia nadmiar enancjomeryczny (+)- $\alpha$ -pinenu w badanych próbkach.



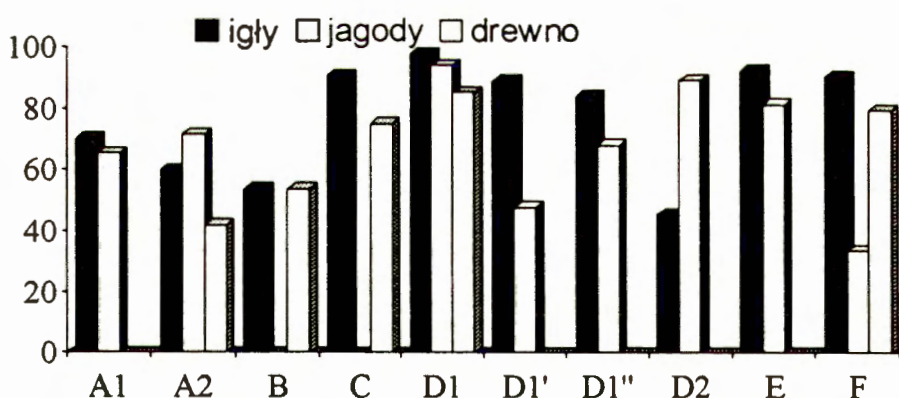
Rys. 10.6 Nadmiar enancjomeryczny (+)- $\alpha$ -pinenu w badanych olejkach jałowcowych

Tabela 10.8 Skład enancjomeryczny frakcji monoterpenu olejów jałowcowych

	A1		A2			B		C		D1			D1'		D1''		D2		E		F		
	n	b	n	b	w	n	w	n	w	n	b	w	n	b	n	b	n	b	n	b	n	b	w
(+)- $\alpha$ -pinen	55,4	56,4	49,4	53,9	42,6	65,3	68,9	59,0	58,4	27,9	42,1	25,4	44,7	17,6	21,0	23,0	64,3	30,9	10,3	14,6	9,6	0,6	10,4
(-)- $\alpha$ -pinen	16,8	22,8	14,4	24,6	21,1	24,4	21,1	20,5	13,7	8,9	14,0	21,8	9,9	27,5	10,7	22,0	25,1	24,7	19,5	55,6	18,2	79,8	16,9
kamfen	0,7	0,4	0,9	0,7	1,8	0,4	0,8	0,6	1,6	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,8	0,2	0,9	0,4	0,2	0,5	0,2
(+)- $\beta$ -pinen	2,9	3,0	2,1	4,4	2,2	2,9	2,6	2,5	2,9	1,3	1,6	2,1	1,6	2,3	1,2	2,0	2,8	2,1	2,6	3,6	1,7	5,3	1,7
(-)-sabinen	2,6	0,5	0,9	0,0	0,6	0,7	0,4	1,8	1,3	33,1	6,0	18,4	24,6	0,7	42,5	15,8	0,3	10,4	25,7	7,3	32,7	0,0	37,9
3-karen	2,6	0,4	1,8	0,0	10,5	0,4	0,8	1,6	5,8	0,2	0,0	5,8	0,7	0,1	3,3	0,1	0,2	0,5	0,0	0,6	0,0	0,0	0,5
myrcen	4,0	12,2	9,5	14,1	5,2	3,2	2,6	3,9	2,0	4,4	21,5	3,5	4,9	46,3	5,7	26,4	3,0	26,0	6,5	12,7	6,6	9,9	3,2
$\alpha$ -terpinen	0,6	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,5	2,2	1,6	0,0	2,4	1,3	0,1	0,5	1,5	1,1	6,3	0,0	5,7
(+)-limonen	5,7	2,4	1,2	1,2	2,2	1,0	1,0	4,1	7,0	15,6	9,5	10,0	5,0	1,7	3,4	2,1	0,8	1,7	7,2	1,9	3,8	0,8	2,6
(-)-limonen	1,0	0,5	0,3	0,2	0,9	0,3	0,3	0,2	1,0	0,2	0,3	0,8	0,3	0,6	0,3	0,4	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,4	0,3
$\beta$ -felandren	4,9	0,7	19,1	0,0	7,9	0,6	0,5	5,6	3,8	0,8	0,5	1,0	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	5,1	0,6	1,2	0,7	0,9
$\gamma$ -terpinen	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	2,2	0,9	3,5	2,7	0,1	4,2	2,5	0,1	1,2	11,8	1,9	10,7	0,0	10,1
p-cymen	1,0	0,7	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	3,0	1,2	0,6	2,8	1,0	0,2	1,0	1,0	0,1	0,4	1,6	0,6	1,0	0,1	3,0
terpinolen	0,8	0,0	0,0	0,0	3,1	0,7	0,8	0,0	0,0	1,8	1,1	2,1	1,9	0,8	2,4	1,9	0,6	0,9	2,5	0,0	4,4	0,4	3,0

We wszystkich próbkach pochodzących z północnej części Polski (próbki A-C), (+)- $\alpha$ -pinen jest składnikiem dominującym. W dwóch próbkach (E i F) pochodzących z bardzo odległych siedlisk dominuje (-)- $\alpha$ -pinen. Zaskakująco duże różnice występują w próbkach z tego samego siedliska D - z centralnej części Polski. W olejkach z szyszkogagód z tego siedliska możemy zaobserwować przewagę enancjomeru (+) w próbce D1, przewagę enancjomeru (-) w próbce D1' jak również prawie racemiczny skład w próbce D1". Różnice w składzie enancjomerycznym  $\alpha$ -pinenu pomiędzy olejkami z szyszkogagód a olejkami z igieł w obrębie tej samej rośliny D1' są bardzo znaczne, podobne zróżnicowanie znaleziono dla olejków sosnowych (*Pinus sylvestris*) [104]. W każdej z badanych próbek nadmiar enancjomeryczny (+)- $\alpha$ -pinenu jest wyższy w igłach niż w szyszkogagodach.

Rys. 10.7 przedstawia nadmiar enancjomeryczny (+)-limonenu w badanych olejkach.



Rys. 10.7 Nadmiar enancjomeryczny (+)-limonenu w badanych olejkach jałowcowych

We wszystkich analizowanych próbkach olejków obserwujemy dużą przewagę (+)-limonenu nad jego enancjomerycznym antypodem, co jest cechą charakterystyczną dla olejków eterycznych roślin z rodziny *Rutaceae*, podczas gdy dla olejków z roślin rodziny *Pinaceae* (-)-limonen jest enancjomerem dominującym [104, 105, 106].



Wśród wszystkich chiralnych monoterpenów występujących w olejkach jałowcowych najbardziej zróżnicowany w swoim składzie enancjomerycznym okazał się  $\alpha$ -pinen.

Pozostałe chiralne monoterpeny występują albo w postaci jednego enancjomeru albo jak w przypadku limonenu z dużą przewagą jednego z nich.

Nie zaobserwowano znaczących różnic w składzie monoterpenów w próbkach zebranych z tej samej rośliny jesienią i na wiosnę oraz pomiędzy szyszkogodami niedojrzałymi - zielonymi i dojrzałymi - czarnymi (A1 i A2).

Przedstawione wyniki wykazują konieczność podjęcia bardziej szczegółowych badań obejmujących kontrolę genetyczną oraz warunki ekologiczne badanych roślin w celu wyodrębnienia czynników wpływających na skład enancjomeryczny węglowodorów monoterpenowych. Rezultaty badań zostały opublikowane [107].

## 11. Dyskusja i wnioski

Celem pracy była optymalizacja metody chromatografii gazowej do rozdzielania różnego typu izomerów w tym enancjomerów monoterpenuidów. Do realizacji tego celu zastosowano naturalne cyklodekstryny jako modyfikatory klasycznych kolumn chromatograficznych.

Podstawę do optymalizacji systemów chromatograficznych stanowiło poznanie procesów zachodzących na kolumnach modyfikowanych cyklodekstrydami.

Zaprojektowano prosty model mechanizmów retencji a następnie poddano go weryfikacji eksperymentalnej.

Według zaproponowanego modelu w przypadku badanych systemów chromatograficznych możliwe jest tworzenie się kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn z monoterpenuami o stechiometrii 1:1 i 2:1. W pierwszym przypadku zależność czasów retencji od stężenia cyklodekstryn powinna być liniowa zgodnie z równaniem 6.7:

$$t_R = t_R^0(1 + K_1[CD])$$

natomiast gdy tworzą się kompleksy cyklodekstryna - badany związek o stechiometrii 2:1 otrzymuje się zależność kwadratową zgodnie z równaniem 6.9:


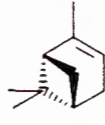







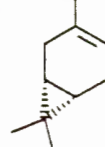


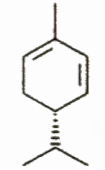
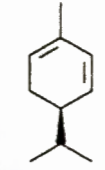
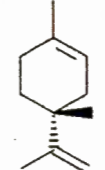
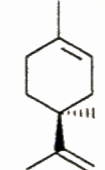
$$t_R = t_R^0(1 + K_1[CD] + K_2[CD]^2)$$

W pierwszym etapie optymalizacji zbadano wpływ poszczególnych cyklodekstryn na chromatograficzne zachowanie się wybranych monoterpenuów.

Na podstawie wyników badań można było sformułować następujące wnioski:

- wszystkie trzy cyklodekstryny tworzą kompleksy inkluzyjne z badanymi związkami ponieważ czasy retencji na kolumnach cyklodekstrynowych okazały się dłuższe niż na porównawczych kolumnach matrycowych,
- $\beta$ -cyklodekstryna tworzy najtrwalsze kompleksy z badanymi substancjami gdyż najbardziej wydłuża czasy retencji w badanych układach,
- w badanych układach jedynie  $\alpha$ -cyklodekstryna jest enancjoselektywna - umożliwia rozdzielenie enancjomerów, natomiast bardzo słabo rozróżnia lub wcale nie rozróżnia izomerów konstytucyjnych w przeciwieństwie do  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn, które nie wykazują dostrzegalnej enancjoselektywności za to w dużym stopniu rozróżniają izomery konstytucyjne,
- współczynniki rozdzielania  $\alpha$  dla enancjomerów monoterpenu (współczynniki enancjoselektywności) uzyskane na kolumnach zawierających formamidowe roztwory  $\alpha$ -cyklodekstryny są bardzo wysokie (np. w przypadku kamfenu wartość  $\alpha$  przekracza 2,4), podczas gdy współczynniki te otrzymane dla tych samych związków na kolumnach kapilarnych zawierających roztwory pochodnych cyklodekstryn nie przekraczają na ogół wartości 1,1. Rozdzielenie enancjomerów jest w tych przypadkach osiągane jedynie dzięki wysokiej sprawności kolumn kapilarnych. Dla porównania w Tabeli 11.1 zestawiono współczynniki rozdzielania  $\alpha$  oraz kolejność wymywania poszczególnych enancjomerów na kolumnie zawierającej  $\alpha$ -cyklodekstrynę otrzymanych na podstawie danych retencyjnych przedstawionych w Tabeli 7.2 (w rozdziale 7) oraz na kolumnie kapilarnej zawierającej 6-metylo-2,3-pentylo- $\beta$ -cyklodekstrynę (dane literaturowe) [108].

Tabela 11.1 Współczynniki rozdzielania ( $\alpha$ ) oraz kolejność wymywania enancjomerów otrzymane na kolumnie z  $\alpha$ -cyklodekstryną (0,15 m), temp. 40°C oraz z 6-me-2,3-pe- $\beta$ -cyklodekstryną (25 m kolumna kapilarna pokryta 6-me-2,3-pe- $\beta$ -CD/OV1701 (1:1, w/w), temp. 35°C) [108]

Nazwa związku	forma (+)	forma (-)	$\alpha$ -CD		6-me-2,3-pe- $\beta$ -CD	
			Pierwszy wymywany	$\alpha$	Pierwszy wymywany	$\alpha$
$\alpha$ -pinen			(+)	2,172	(-)	1,054
$\alpha$ -tujen			(+)	1,824	(+)	1,045
kamfen			(+)	2,423	(-)	1,074
$\beta$ -pinen			(+)	1,661	(-)	1,034
3-karen			(+)	1,094	(+)	1,040
sabinen			(+)	1,365	(+)	1,063
$\alpha$ -felandren			(+)	1,470	(-)	1,020
limonen			(-)	1,088	(-)	1,026

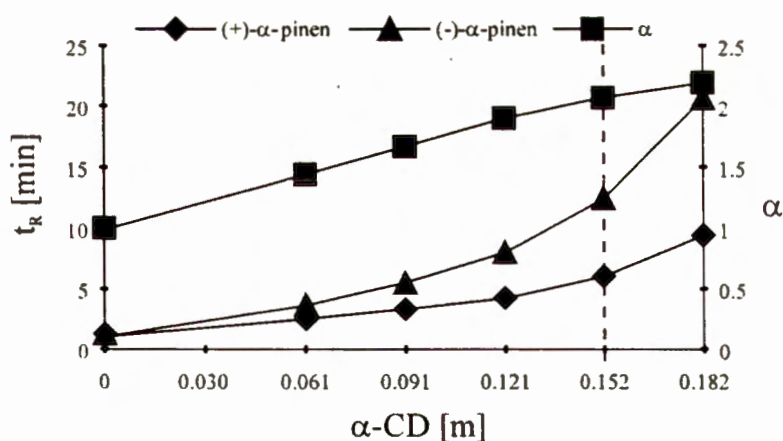
W następnym etapie optymalizacji układu chromatograficznego zbadano wpływ stężenia cyklodekstryn na podstawowe parametry chromatograficzne. to znaczy: czas

retencji i współczynnik rozdzielania wybranych modelowych monoterpenu. Na podstawie tych badań można było stwierdzić odmienne zachowanie się poszczególnych cyklodekstryn w badanych systemach:

- zależność czasów retencji od stężenia  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryn jest liniowa co sugeruje, że tworzą one z badanymi związkami kompleksy o stechiometrii 1:1,
- zależność czasów retencji od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny jest kwadratowa i może to świadczyć, że tworzy ona z badanymi monoterpenu kompleksy o stechiometrii 2:1,
- współczynnik rozdzielania  $\alpha$  otrzymany dla enancjomerów modelowych

monoterpenu w zależności od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny rośnie asymptotycznie.

Umożliwiło to wybranie optymalnego stężenia na poziomie 0,15 m to znaczy w punkcie gdzie uzyskuje się już bardzo wysoki współczynnik rozdzielania a czasy retencji nie są nadmiernie wydłużone, jak to widać na przykładzie enancjomerów  $\alpha$ -pinenu na rys. 11.1.

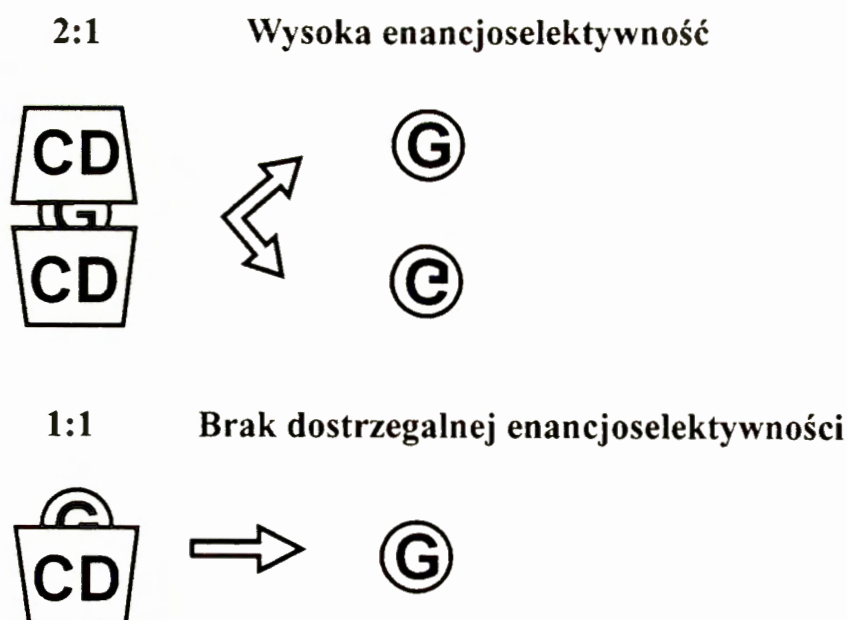


Rys. 11.1 Zależność zredukowanych czasów retencji i współczynnika enancjoselektywności  $\alpha$  dla (+/-)- $\alpha$ -pinenu od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny; temp. 40°C, kolumna o wymiarach 2m x 4 mm.

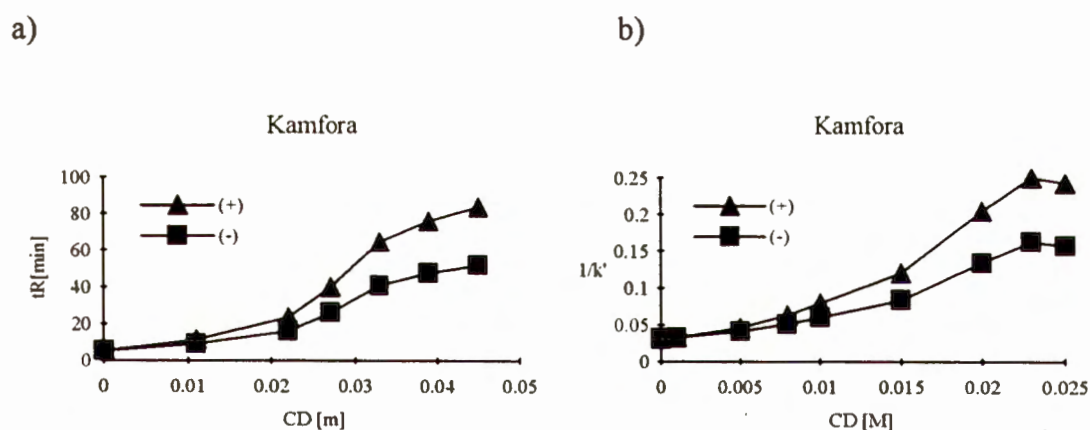
Zastosowanie gliceryny zamiast formamidu jako rozpuszczalnika cyklodekstryn do przygotowania faz stacjonarnych umożliwiło rozszerzenie tej metody analitycznej do badania wielu pochodnych monoterpenowych (ketonów, alkoholi, aldehydów, fenoli). Zbadanie wpływu stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny na parametry retencji szeregu chiralnych alkoholi i ketonów wykazało, że:

- w przypadku związków których zależność czasów retencji od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny jest liniowa czyli tworzone są kompleksy o stechiometrii 1:1 nie obserwujemy dostrzegalnej enancjoselektywności,
- w przypadku związków których zależność czasów retencji od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny jest kwadratowa co sugeruje, że tworzą one z cyklodekstryną kompleksy o stechiometrii 1:2 udało się uzyskać rozdzielanie ich enancjomerów.

Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że wysoka enancjoselektywność jaką uzyskujemy w przypadku stosowania roztworów  $\alpha$ -cyklodekstryny jest związana z tworzeniem przez nią kompleksów o stechiometrii 2:1 z rozdzielanymi enancjomerami monoterpenów. Gdy tworzone są kompleksy o stechiometrii 1:1 nie dostrzegamy zauważalnej enancjoselektywności.



Właściwość  $\alpha$ -cyklodekstryny tworzenia kompleksów z monoterpunami o stechiometrii 2:1, udało się potwierdzić niezależnie również w warunkach wysokosprawnej chromatografii cieczowej, gdzie  $\alpha$ -cyklodekstrynę zastosowano jako dodatek do fazy ruchomej. Rys. 11.2 przedstawia zależność czasów retencji  $t_R$  uzyskanych w chromatografii gazowej oraz odwrotności współczynników pojemnościowych  $1/k'$  uzyskanych w wysokosprawnej chromatografii cieczowej od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny. W metodzie chromatografii gazowej dodatek  $\alpha$ -cyklodekstryny do fazy ruchomej powoduje skrócenie czasu wymywania tej substancji która tworzy z cyklodekstryną kompleksy inkluzyjne a więc efekt jest przeciwny niż w chromatografii gazowej gdzie obserwujemy wydłużenie czasów retencji. Przebieg uzyskanych krzywych jest podobny i może on świadczyć, że w obydwu przypadkach tworzą się kompleksy cyklodekstryna - kamfora o stechiometrii 2:1.



Rys. 11.2 Zależność zredukowanych czasów retencji (a) oraz odwrotności współczynnika pojemnościowego w HPLC (b) od stężenia  $\alpha$ -cyklodekstryny uzyskanych (a) metodą chromatografii gazowej na kolumnie 2 m x 4mm temp. 95°C, przepływ gazu nośnego 40 ml/min (b) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie o wymiarach 1 x 250 mm wypełnionej LiChromosorbem RP18 5  $\mu$ m, det. UV-VIS 280 nm eluent 35:65 v:v MeOH:H<sub>2</sub>O 0,04 ml/min dla enancjomerów kamfory

Stwierdzone różnice we właściwościach rozdzielczych poszczególnych cyklodekstryn wykorzystano do zaprojektowania i wykonania systemu imitującego chromatografię dwuwymiarową. Połączone szeregowo w jednej kolumnie wypełnienia z  $\alpha$ - oraz  $\gamma$ -cyklodekstryną o obliczonych teoretycznie stężeniach i proporcjach przy założeniu addytywności czasów retencji, umożliwiły jednoczesne rozdzielenie izomerów konstytucyjnych oraz enancjomerów modelowych monoterpenów. Metoda ta umożliwia zaprojektowanie systemu o pożądanej zdolności rozdzielczej wobec różnych mieszanin izomerów za pomocą wyboru odpowiednich cyklodekstryn oraz ich stężeń.

Jako dalszy kierunek badań autorka widzi przeniesienie badanego systemu z kolumn pakowanych na kolumny kapilarne, które wykazują znacznie wyższą efektywność i sprawność. Może się to wiązać z poszukiwaniem nowego rozpuszczalnika cyklodekstryn o wyższej temperaturze wrzenia niż gliceryna.



## STRESZCZENIE

Celem pracy była optymalizacja metody chromatografii gazowej przeznaczonej do rozdzielania różnego typu izomerów w tym enancjomerów związków terpenowych. Do realizacji tego celu zastosowano naturalne cyklodekstryny jako modyfikatory klasycznych kolumn chromatograficznych. Obiektem badań była grupa związków monoterpenowych najczęściej występujących w roślinach w postaci skomplikowanych mieszanin różnych izomerów.

Zaproponowano teoretyczny model mechanizmów retencji w systemie chromatografii gazowej modyfikowanej cyklodekstrydami rozpuszczonymi w fazie stacjonarnej.

Zbadano różnice we wpływie poszczególnych cyklodekstrydów ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -) na chromatograficzne zachowanie się monoterpenów oraz wpływ stężenia tych cyklodekstrydów na parametry retencji wybranych modelowych czterech par enancjomerów węglowodorów monoterpenowych.

Stwierdzono istotne różnice we wpływie poszczególnych cyklodekstrydów na badane związki. W badanym systemie jedynie  $\alpha$ -cyklodekstryna wykazuje dostrzegalną enancjoselektywność natomiast jest słabym separatorem izomerów konstytucyjnych w przeciwieństwie do  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstrydów które nie umożliwiają rozdzielania enancjomerów za to cechują się wysoką selektywnością wobec izomerów konstytucyjnych. Przeprowadzone badania wskazują na różną stechiometrię tworzenia się kompleksów inkluzyjnych;  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny tworzą kompleksy z badanymi terpenami o stechiometrii 1:1, natomiast  $\alpha$ -cyklodekstryna tworzy kompleksy o stechiometrii 2:1.

Zastosowanie gliceryny jako rozpuszczalnika cyklodekstryn do przygotowania stereoselektywnych faz stacjonarnych umożliwiło rozdzielenie wielu tlenowych pochodnych związków monoterpenowych.

Zaprojektowano system szeregowego połączenia dwóch wypełnień z  $\alpha$ - oraz  $\gamma$ -cyklodekstryną umożliwiającą jednoczesne rozdzielenie enancjomerów oraz izomerów konstytucyjnych w mieszaninach monoterpenów. System ten imitujący chromatografię dwuwymiarową poddano następnie weryfikacji eksperymentalnej uzyskując dobrą zgodność wyników doświadczalnych z zaprojektowanymi teoretycznie.

Ostatecznie w badanych systemach zoptymalizowane zostały:

- parametry retencji,
- selektywność w tym również enancjoselektywność,
- układ szeregowego połączenia wypełnień z dwoma cyklodekstrynami.

Nie zajmowano się dynamiką procesów chromatograficznych, gdyż wymagałoby to znacznego rozszerzenia pracy.

Opracowane systemy chromatograficzne modyfikowane cyklodekstrynami wykorzystano praktycznie do analizowania mieszanin związków monoterpenowych o znaczeniu przemysłowym i farmaceutycznym.

## LITERATURA

---

1. A. J. Hills, P.R. Zimmerman, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1055.
2. R. Croteau, *Chem. Rev.*, 87 (1987) 929-954.
3. W. Boland, J. Hopke, J. Donath, J. Nüske, F. Bublitz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 15 (1995) 1600.
4. I. Esteban, F. Bergmann, H.-R. Gregorius, O. Huhtinen, *Silvae Genetica* 25 (1976) 59-66.
5. R. Yazdani, J.E. Nilsson, T. Ericsson, *Silvae Genetica* 34, (1985) 201-208.
6. B. Fady, M. Arbez, A. Marpeau, *Trees* 6 (1992) 162-171.
7. C. Bernard-Dagan w *Genetics Manipulation of Woody Plants*, ed. J.W. Hanover, D.A. Keathley, Plenum Publishing Corporation, 1988.
8. W. Templeton, *An Introduction to the Chemistry of Terpenoids and Steroids*, Butterworths, London 1969, p.34-36.
9. R.S. Cahn, C.K. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5 (1966) 358.
10. H. Dodziuk, *Tetrahedron* 52 (1996) 12941.
11. P. Evers, A. Krüger, W.A. König, prezentacja posterowa na "24th International Symposium on Essential Oils", Berlin, 1993.
12. R. Ochocka, D. Sybilska, M. Asztemborska, J. Kowalczyk, J. Goronowicz, J. *Chromatogr.*, 543 (1991) 171.
13. K. Sjödin, M. Persson, A.-K. Borg-Karlson, T. Norin, *Phytochemistry* 41 (1996) 439.
14. U. Ravid, E. Putievsky, I. Katzir, *Flavour Fragrance J.*, 9 (1994) 139.
15. R. Hiltunen, I. Laakso, *Flavour Fragrance J.*, 10 (1995) 203.

- 
16. J.R. Ochocka, M. Asztemborska, D.R. Zook, D. Sybilska, G. Perez, L. Ossicini, *Phytochemistry* 44 (1997) 869.
  - 17 V. Schurig, U. Leyrer, U. Kohnle, *Naturwissenschaften*, 72 (1985) 211.
  18. M. Lindström, T. Norin, I Valterová, J. Vrkoc, *Naturwissenschaften*, 77 (1990) 134-135.
  19. W. Gaffield w *Studies in Natural Products Chemistry*, ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam 1990.
  20. A.R. Pinder, *The Chemistry of the Terpenes*, Chapman & Hall, 1960, p.20-22.
  21. W.A. König, R. Krebber, P. Evers, G. Bruhn, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13 (1990) 328.
  22. R.J. Ochocka, D. Sybilska, M. Asztemborska, J. Kowalczyk, J. Goronowicz, *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 171.
  23. W.A. König, A. Krüger, D. Icheln, T. Runge, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15 (1992) 184.
  24. U. Ravid, E. Putievsky, I. Katzir, *Flavour Fragrance J.*, 9 (1994) 205.
  25. X. Wang, C. Jia, H. Wan, *J. Chromatogr. Sci.*, 33 (1995) 22.
  26. U. Ravid, E. Putievsky, I. Katzir, *Flavour Fragrance J.*, 11 (1996) 191.
  27. *Advances in Chromatography*, ed. P.K. Brown, E. Grushka, Marcel Dekker Inc., New York.
  28. *Chromatographic Reviews*, ed. M. Lederer, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
  29. *Journal of Chromatography Library*, ed. E. Heftman, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

- 
30. W. Rödel, G. Wölm, *Chromatografia Gazowa*, Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa 1992.
  31. Z. Witkiewicz, *Podstawy Chromatografii*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1995.
  32. C.F. Poole, S.A. Schuette, *Contemporary practice of chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1984.
  33. J.J. Kirkland, *Współczesna chromatografia cieczowa*, PWN Warszawa 1976.
  34. H.J. Cortes, *Multidimensional chromatography using on-line coupled microcolumn liquid chromatography and capillary gas chromatography*, Doctoral Thesis, University of Stockholm 1990.
  35. C. Horvath, W. Melander, "Theory of Chromatography" rozdział 3 w *Journal of Chromatography Library*, ed. E. Heftman, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 22A (1983) A45.
  36. E. Kovats, *Helvet. Chim. Acta*, 41 (1958) 1915.
  37. E. Benes, G. Szejtli, (1996) *The 8th International Cyclodextrin Symposium*, Abstrakt 1-p27.
  38. T. Nakagawa, K. Ueno, M. Kashiwa, J. Watanabe, *Tetrahedron Lett.*, 35 (1994) 1921.
  39. W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19 (1980) 344.
  40. S. Li, W.C. Purdy, *Chem. Rev.*, 92 (1992) 1457.
  41. D. Diaz, I. Vargas-Baca, J. Garcia-Mora, *J. Chem. Education*, 71 (1994) 708.
  42. K.-H. Frömring, J. Szejtli, *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publishers, 1994 Dordrecht.

- 
43. A.W. Coleman, I. Nicolis, N. Keller, J.P. Dalbiez, *J. Incl. Phenom.*, 13 (1992) 139.
  44. J. Szejtli, "Cyclodextrins and their Inclusion Complexes", Akademiai Kiado, 1982  
Budapest.
  45. D. Duchene, "Cyclodextrins and their industrial uses", Editions de santé, 1987,  
Paris.
  46. J. Szejtli, "Cyclodextrin Technology", Kluwer Academic Publishers, 1988  
Dordrecht.
  47. E. Smolkova-Keulemansova, *J. Chromatogr.*, 251 (1982) 17.
  48. Z. Juvancz, P. Petersson, *J. Microcol. Separation*, 8 (1996) 99.
  49. E. Smolkova, H. Kralova, S. Krysl, L. Feltl, *J. Chromatogr.*, 241 (1982) 3.
  50. J. Mraz, L. Feltl, E. Smolkova-Keulemansova, *J. Chromatogr.*, 286 (1984) 17.
  51. S. Krysl, E. Smolkova-Keulemansova, *J. Chromatogr.*, 349 (1985) 167.
  52. E. Smolkova-Keulemansova, E. Neumannova, L. Feltl, *J. Chromatogr.*, 365 (1986)  
279.
  53. G.L. Reid , III, C.A. Monge, W.T. Wall, D. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 633  
(1993) 135.
  54. G.L. Reid , III, W.T. Wall, D. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 633 (1993) 143.
  55. G.L. Reid , III, D. Armstrong, *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994) 151.
  56. Y. Mizobuchi, M. Tanaka, T. Shono, *J. Chromatogr.*, 194 (1980) 153.
  57. D.M. Sand, H. Schlenk, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1624.
  58. H. Schlenk, J.L. Gellerman, D.M. Sand, *Anal. Chem.*, 34 (1962) 1529.
  59. B. Casu, M. Reggiani, G.R. Sanderson, *Carbohydr. Res.* 76 (1979) 59.
  60. W.A. König, S. Lutz, P. Mischnick-Lübbecke, B. Brassat, *J. Chromatogr.*, 447  
(1988) 193.

- 
61. W.A. König, S. Lutz, G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27 (1988) 979.
62. V. Schurig, H.-P. Nowotny, *J. Chromatogr.*, 441 (1988) 155.
63. V. Schurig, H.-P. Nowotny, D. Schmalzing, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28 (1989) 736.
64. W.Y. Li, H.L. Jin, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 509 (1990) 303.
65. D. W. Armstrong, W. Li, C.-D. Chang, J. Pitha, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 914.
66. V. Schurig, V. Schmalzing, U. Muhleck, M. Jung, M. Schleimer, P. Mussche, C. Duvekot, J.C. Buyten, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13 (1990) 713.
67. P. Fischer, R. Aickholz, M. Juza, S. Krimmer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29 (1990) 427.
68. W. A. König, "Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins", Hüthig Buch Verlag, 1992 Heidelberg.
69. E. Guichard, A. Hollnagel, A. Mosandl, H.-G. Schmarr, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13 (1990) 299.
70. G. Bruche, A. Dietrich, A. Mosandl, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 16 (1993) 101.
71. W.A. König, A. Krüger, D. Icheln, T. Runge, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15 (1992) 184.
72. U. Ravid, E. Putievsky, I. Katzir, *Flavour Fragr. J.*, 9 (1994) 139.
73. U. Ravid, E. Putievsky, I. Katzir, *Flavour Fragr. J.*, 9 (1994) 205.
74. D. Sybilska, T. Kościelski, *J. Chromatogr.*, 261 (1983) 357.
75. T. Kościelski, D. Sybilska, J. Jurczak, *J. Chromatogr.*, 280 (1983) 131.
76. T. Kościelski, D. Sybilska, S. Belniak, J. Jurczak, *Chromatographia*, 19 (1984) 292.

- 
77. T. Kościelski, D. Sybilska, S. Belniak, J. Jurczak, *Chromatographia*, 21 (1986) 413.
78. T. Kościelski, D. Sybilska, *J. Chromatogr.*, 349 (1985) 3.
79. T. Kościelski, D. Sybilska, J. Lipkowski, A. Miediokritskaja, *J. Chromatogr.*, 351 (1986) 512.
80. L. Ossicini, G. Perez, G. Caponecchi, A. Cristalli, D. Sybilska, T. Kościelski, J. Goronowicz, *J. Chromatogr.*, 547 (1991) 283.
81. E. Gil-Av, J. Herling, *J. Phys. Chem.*, 66 (1962) 1208.
82. D.F. Cadogan, J.H. Purnell, *J. Chem. Soc. A*, (1968) 2133.
83. R.S. Juvet, V.R. Shaw, M.A. Khan, *J. Am. Chem. Soc.*, 91 (1969) 3788.
84. M. Jung, D. Schmalzing, V. Schurig, *J. Chromatogr.*, 552 (1991) 43.
85. V. Schurig, M. Juza, *J. Chromatogr. A*, 757 (1997) 119.
86. I Hardt, W.A. König, *J. Microcol. Sep.*, 5 (1993) 35.
87. M. Jung, V. Schurig, *J. Microcol. Sep.*, 5 (1993) 11.
88. A. Botsi, B. Perly, E. Hadjoudis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2 (1997) 89.
89. D.Y. Pharr, Z.S. Fu, T.K. Smith, W.L. Hinze, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 275.
90. A. Mosandl, C. Askari, U. Hener, D. Juchelka, D. Lehmann, P. Kreis, C. Motz, U. Palm, H.-G. Schmarr, *Chirality*, 4 (1992) 50.
91. W. A. König, B. Gehrcke, D. Icheln, P. Evers, J. Dönnecke, W. Wang, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 6 (1992) 367.
92. K. Sjödin, M. Persson, A.-K. Borg-Karlson, T. Norin, *Phytochemistry*, 41 (1996) 439.
93. G. Schomburg, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 309.



- 
94. D. Sybilska, J. Kowalczyk, M. Asztemborska, T. Stankiewicz and J. Jurczak, J. Chromatogr. 543 (1991) 397.
95. W.R. Ellis, KW. Somerville, B.H. Whitten, G.D. Bell, Br. Med. J.Clin. Res., 289 (1984) 153.
96. D. Engelstein, E. Kahan, C. Servadio, J. Urol., 98 (1992) 98.
97. M. Lis-Balchin, R.J. Ochocka, S. Deans, M. Asztemborska, S. Hart, Med. Sci. Res., 24 (1996) 309.
98. M. Lis-Balchin, R.J. Ochocka, S. Deans, Flav. Fragr. J. praca w druku.
99. D. Sybilska, J. Kowalczyk, M. Asztemborska, R. Ochocka, H. Lamparczyk, J. Chromatogr. A, 665 (1994) 67.
100. G. Vernin, C. Boniface, J. Metzger, C. Ghiglione, A. Hammoud, K. Suon, D. Fraisse, C. Parkanyi, Phytochemistry, 41 (1988) 1061.
101. L. Gelsomini, V. Vidrich, P. Fusi, M. Michelozzi, J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun., 11 (1988) 218.
102. A. Baerheim Svendsen, J. Scheffer, A. Looman, Sci. Pharm., 53 (1985) 159.
103. D. Sybilska, M. Asztemborska, J. Kowalczyk, R.J. Ochocka, L. Ossicini, G. Perez, J. Chromatogr. A, 659 (1994) 389.
104. K. Sjödin, M. Persson, A.-K. Borg-Karlson, T. Norin, Phytochemistry, 41 (1996) 439.
105. R. Ochocka, D. Sybilska, M. Asztemborska, J. Kowalczyk, J. Goronowicz, J. Chromatogr., 543 (1991) 171.
106. D. Sybilska, R.J. Ochocka, M. Asztemborska, W.S. Brud, Proceedings z 25th International Symposium on Essential Oils, ed. Association des Ingenieurs et Techniciens de la Parfumerie, Grasse, France, 1994 str. 64.

- 
107. J. R. Ochocka, M. Asztemborska, D. R. Zook, D. Sybilska, G. Perez, L. Ossicini,  
Phytochemistry 44 (1997) 869.
108. W.A. König, A. Krüger, D. Icheln, T. Runge, J. High Resolut. Chromatogr., 15  
(1992) 184.



B 328/98

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PA

F-B.328/1998



80000000002659