

Izolace enantiomerů karvonu z přírodního materiálu.

Karvon je přírodní látka, chemickou podstatou nenasycený keton, která patří mezi monoterpeny. Molekula karvonu obsahuje jedno centrum chiralidy, proto karvon existuje ve formě dvou enantiomerů. Je známo, že tyto enantiomery se výrazně liší svou vůní. Levotočivý (*R*)-karvon má sladkou mátovou vůni, naopak pravotočivý (*S*)-karvon vůni připomíná kmín. Jednotlivé enantiomery lze izolovat z rostlinných silic. (*S*)-Karvon je složkou silice ze semen kmínu kořeného (*Carum carvi*), ve které podle literatury tvoří 50–60 %. Druhou nejvýznamnější složkou silice kmínu je limonen (35–35 %). Dále lze (*S*)-karvon nalézt v silici kopru vonného (*Anethum graveolens*), ve které je jeho zastoupení 30–60 %. Druhý enantiomer karvonu, tedy (*R*)-karvon, tvoří až 70 % silice máty klasnaté (*Mentha spicata*) (Morcia, 2016). Druhou podstatnou složkou silice máty klasnaté je opět limonen v zastoupení asi 10 %. Další složky silice tvoří různé látky povětšinou terpenické povahy. Složení silic rostlin kolísá, například vlivem podnebí nebo jiných environmentálních faktorů (Hussain, 2010).



Vůně rostlinných silic nemusí být vždy dána dominantními složkami silice, ale může se na ní výrazně podílet látka přítomná ve stopovém množství. Dlouho se například tradovalo, že jeden enantiomer limonenu se podílí na vůni pomerančů a druhý na vůni citrónů. Ukazuje se však, že vůně silice je u pomeranče a citrónu způsobena minoritními složkami silic. Sensorické zkoumání čistých enantiomerů limonenu ukázalo, že jejich vůně je lidmi spíše připodobňována k vůni terpentýnu. V případě enantiomerů karvonu se tohoto obávat nemusíme (Kvittingen, 2021). Oba enantiomery karvonu byly připraveny synteticky. Sensorické zkoumání ukázalo, že vůně čistých, synteticky připravených, enantiomerů je podobná vůni látek izolovaných z přírodních zdrojů (Leitereg, 1971).

Izolace (*R*)-(-)-karvonu ze silice máty klasnaté

Silice máty klasnaté je komerčně dostupná (pod názvem silice máty kadeřavé). Podle mé analýzy plynovou chromatografií obsahuje tato silice 80 % karvonu a 15 % limonenu. Další minoritní složky se nepodařilo identifikovat. Teploty varu limonenu je za atmosférického tlaku 180 °C (Sevgili, 2008). Teplota varu karvonu je za stejného tlaku 230 °C (Cottee, 1967). Rozdíl 50 °C v teplotách varu dvou hlavních složek silice dává naději na oddělení velké části limonenu ze silice destilací.

Destilace byla vyzkoušena ve dvou variantách. Nejdříve byla využita klasická zábrusová destilační aparatura se zábrusy NZ 14, která zahrnovala destilační baňku (50 cm³), destilační nástavec s teploměrem, vodou chlazený sestupný chladič, alonž a baňky jako vyměnitelné předlohy. K zahřívání byla použita vzdušná lázeň, jejíž teplota byla sledována teploměrem. Destilací se podařilo získat frakce výrazně obohacené o karvon, nejčistější frakce obsahovala 92 % karvonu, 5 % limonenu a zbytek tvořily neidentifikované složky. Aby tato destilace fungovala, bylo potřeba destilovat relativně velké množství silice (cca 10 cm³). Proto jsem se rozhodl vyzkoušet destilaci ve zjednodušené destilační aparatuře, která by umožňovala pracovat s menšími objemy silice. Aparatura je ukázána na následujícím obrázku.



V podstatě se jedná o (zábrusovou) zkumavku vysokou 12 cm s prodlouženým bočním vývodem směřujícím dolů, který funguje jako vzdušný chladič. Do hrdla zkumavky lze vložit teploměr tak, aby banička teploměru byla v místě, kudy proudí páry do vzdušného chladiče. Do zkumavky byla nalita silice a směs byla zahřívána opět vzdušnou lázní, která byla zhotovena z kádinky (100 cm³) zakryté alobalem a položené na plotýnkovém vařiči. Teplota ve vzdušné lázni byla sledována teploměrem. Postupným zvyšováním teploty v lázni a jímáním frakcí podle teploty par do vialek bylo získáno několik frakcí. Analýza plynovou chromatografií ukázala, že se podařilo získat frakci o podobném složení (92% čistota karvonu) jako při klasické destilaci. Aparatura pro tuto destilaci zachycuje následující obrázek.



Chemikálie a materiál:

Silice máty kadeřavé.

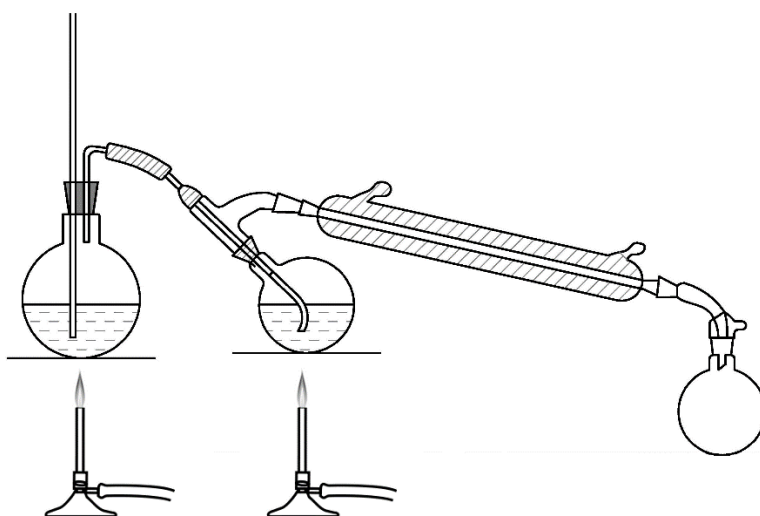
Postup:

- Sestavíme aparaturu pro prostou destilaci z laboratorního skla se zábrusy NZ14. Do destilační baňky nalijeme 10 cm³ silice máty kadeřavé a přidáme varný kamínek (větší porcelánový střep).
- Destilační baňku umístíme do topného hnízda a na stojan uchytneme teploměr, jehož banička s náplní by měla být ve stejné výšce jako destilační baňka. Prostor s ohřevem zakryjeme kousky alobalu. Vznikne tak vzdušná lázeň.

- Zahájíme zahřívání destilační baňky, intenzitu zahřívání regulujeme podle teploty odečtené z teploměru. Aby destilace probíhala svižně, bude potřeba aby v lázni byla teplota o 40 až 50 °C vyšší než očekávaný bod varu.
- Podle měnící se teploty par odcházejících do chladiče měníme předlohy, do kterých jímáme destilační frakce.
- Frakce jejichž teplota varu se blížíla tabelované hodnotě teploty varu karvonu spojíme a uschováme.

Izolace (S)-(+)-karvonu ze silice semen kmínu kořeného

Tradiční metodou pro izolaci rostlinných silic z rostlinného materiálu je destilace s vodní parou. Aparatura pro tuto destilaci obvykle obsahuje samostatný vyvíječ vodní páry, která prochází nádobou s kusem rostlin, a následně plynná fáze odchází do chladiče.



Kromě toho lze destilaci s vodní parou provést i na prosté destilační aparatuře, jen je potřeba během destilace do destilační baňky dolévat vodu. Fotografie aparatury vidíme na následujícím obrázku.



V literatuře lze nalézt informaci, že praktický výtěžek silice může být až 4,5 % z původní hmotnosti semen kmínu (Amin, 2002). V experimentu jsem vycházel z drceného kmínu dostupného v obchodech s potravinami. Destilací jsem ale byl schopen získat množství silice odpovídající asi jen 1 % hmotností koření. Překvapující byla analýza získané silice pomocí plynové chromatografie. Podle literatury by karvon měl tvořit 50–60 %, druhou složkou silice kmínu by měl tvořit limonen (35–35 %). Analýza silice získané z drceného kmínu ale ukázala, že obsahuje 97 % karvonu a asi jen 2 % limonenu. Možným vysvětlením by mohlo být, že z drcených semen došlo k vytěkání velké části silice, což by vysvětlilo nižší celkový výtěžek, a že došlo k zakoncentrování méně těkavého karvonu. Kmínovou silici lze destilovat podobně jako v případě silice máty klasnaté, aby došlo ke snížení obsahu limonenu.

Chemikálie a materiál:

Kmín drcený nebo celý (30 g), diethylether a bezvodý síran hořečnatý.

Postup pro destilaci s vodní parou na aparatuře se samostatným vyvíječem páry:

- Sestavíme destilační aparaturu podle obrázku. Do vyvíječe páry nalijeme vodu tak, aby zaplnila asi 2/3 objemu baňky, přidáme varné kamínky, baňku uzavřeme nástavcem s kapilárou a začneme baňku zahřívat kahanem.
- Do druhé baňky dáme **30 g** drceného kmínu a přibližně 100 cm³ vody a na baňku nasadíme nástavec pro zavádění vodní páry. K nástavci připojíme chladič s předlohou.
- Vyvíječ páry propojíme s druhou baňkou až v okamžiku, kdy voda začne vřít. Po připojení vyvíječe páry začneme kahanem zahřívat rovněž druhou baňku. Destilujeme 1 až 1,5 hodiny.
- Získanou emulzi silice ve vodě nalijeme do suché dělicí nálevky a extrahujeme 3 x **30 cm³** diethyletheru. Horní vrstvu, která je tvořena roztokem silice v organickém rozpouštědle, odpouštíme do kádinky o objemu 250 cm³. Spojené extrakty vysušíme v kádince pomocí bezvodého síranu hořečnatého. Dobré vysušení extraktu je důležité, protože ether rozpouští poměrně hodně vody. Po odpaření tohoto rozpouštědla by pak mohla zůstat v silici kapka vody.
- Posledním krokem je odpaření diethyletheru z roztoku. Standardně lze rozpouštědlo odpařit pomocí rotační vakuové odparky. Pokud ji nemáme, lze ether ze směsi odpařit na destilační aparatuře (pozor, při zahřívání nelze použít kahan nebo jiný zdroj tepla s otevřeným plamenem nebo horkými plochami, je potřeba destilovat například z vodní lázně zahřívané elektrickým vařičem. Další možností může být odfouknutí těkavého rozpouštědla proudem plynu v digestoři. Zdrojem proudu vzduchu může být například vzduchovací motorek pro akvaristy.

Postup pro destilaci s vodní parou na aparatuře pro prostou destilaci:

- Do destilační baňky o objemu 500 cm³ nasypeme **30 g** drceného kmínu. Přidáme několik varných kamínků a do baňky nalijeme 250 cm³ vody.
- Na baňku nasadíme destilační nástavec a k nástavci připojíme chladič. Pod konec chladiče postavíme kádinku o minimálním objemu 400 cm³. Alonž není potřeba používat.
- Do chladiče pustíme vodu a zahájíme destilaci. Destilační baňku zahříváme pomocí plynového kahanu přes sítku, případně pomocí topného hnízda. Snažíme se udržovat intenzitu zahřívání tak, aby směs svižně destilovala, ale aby současně nedošlo k jejímu vyvření do chladiče. Pokud dochází k utajenému varu, přidáme další varné kamínky.
- Sledujeme objem předdestilované kapaliny. Pokud dojde k předdestilování cca ½ směsi, destilaci na chvíli přerušíme a stejný objem vody doplníme do destilační baňky.

- Směs destilujeme asi **1 až 1,5 hodiny**. Po skončení destilace extrahujeme destilací vzniklou emulzi 3 x **30 cm³** diethyletheru v dělicí nálevce. Pokud nemáme dělicí nálevku k dispozici, můžeme kapaliny protřepat v baňce a následně směs nalít do odměrného válce. Po oddělení vrstev můžeme horní organickou vrstvu opatrně oddělit pomocí pipety.
- Organické extrakty spojíme a přidáme lžičku sušidla (bezvodý síran hořečnatý, případně i sodný). Sušidlo necháme několik minut působit za občasného promíchání. Následně sušidlo od roztoku odfiltrujeme na hladkém filtru.
- Posledním krokem je odpaření diethyletheru z roztoku. Standardně lze rozpouštědlo odpařit pomocí rotační vakuové odparky. Pokud ji nemáme, lze ether ze směsi odpařit na destilační aparatuře (pozor, při zahřívání nelze použít kahan nebo jiný zdroj tepla s otevřeným plamenem nebo horkými plochami, je potřeba destilovat například z vodní lázně zahřívané elektrickým vařičem. Další možností může být odfouknutí těkavého rozpouštědla proudem plynu v digestoři. Zdrojem proudu vzduchu může být například vzduchovací motorek pro akvaristy.

Poznámka k nebezpečným vlastnostem použitých látek.

Diethylether je klasifikován následujícími kategoriemi nebezpečnosti. Připojeny jsou odpovídající H-věty:

Hořlavé kapaliny (Kategorie 1), H224 – Extrémně hořlavá kapalina a páry.

Akutní toxicita, Orálně (Kategorie 4), H302 – Zdraví škodlivý při požití.

Toxicita pro specifické cílové orgány – jednorázová expozice (Kategorie 3), Centrální nervový systém, H336 – Může způsobit ospalost nebo závratě.

Pokyny pro bezpečné zacházení (P-věty):

P210 – Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.

P233 – Uchovávejte obal těsně uzavřený.

P240 – Uzemněte a upevněte obal a odběrové zařízení.

P241 – Používejte elektrické/ ventilační/ osvětlovací zařízení do výbušného prostředí.

P301 + P312 PŘI POŽITÍ – Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/ lékaře.

P403 + P233 – Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte obal těsně uzavřený.

EUH019 – Může vytvářet výbušné peroxidy.

EUH066 – Opakovaná expozice může způsobit vysušení nebo popraskání kůže.

Síran hořečnatý není podle nařízení (ES) č. 1272/2008 nebezpečnou látkou ani směsí.

Karvon je klasifikován následujícími kategoriemi nebezpečnosti. Připojeny jsou odpovídající H-věty:

Sensibilace kůže. 1A, H317 – Může vyvolat alergickou kožní reakci.

Pokyny pro bezpečné zacházení (P-věty):

P261 – Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte.

P272 – Nebezpečí výbuchu.

P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle.

P302 + P352 – PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla.

P333 + P313 – Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

P362 + P364 – Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Literatura:

Amin, G., & Peter, K. V. (Ed.), (2012). Cumin. In *Handbook of Herbs and Spices, Volume 1*. Philadelphia, Pa: Woodhead Publishing Limited.

Cottee, F. H., Straughan, B. P., Timmons, C. J., Forbes, W. F., & Shilton, R., (1967). Spectroscopic studies. Part II. Steric conformations of some α,β -unsaturated ketones. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 1146.

Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010) Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827.

Kvittingen, L., Sjørsnes, B. J., & Schmid, R., (2021). Limonene in Citrus: A String of Unchecked Literature Citings? *Journal of Chemical Education*, 98(11), 3600.

Leitereg, T. J., Guadagni, D. G., Harris, J., Mon, T. R., & Teranishi, R., (1971). Chemical and sensory data supporting the difference between the odors of the enantiomeric carvones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(4), 785.

Morcia, C., Tumino, G., Ghizzoni, R., Terzi, V., & Preedy, V. R. (Ed.) (2016). Carvone (*Mentha spicata* L.) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Cambridge, Ma: Academic Press.

Sevgili, L. M., Sahin, S., & Kirbaslar, S. I., (2008). Liquid-Liquid Equilibria of (Limonene + Linalool + Ethylene Glycol or Diethylene Glycol or Triethylene Glycol or 1,2-Propylene Glycol) Ternary Systems. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 53(3), 737.