

ОСОБЕННОСТИ АНАЛИЗА СОСТАВА ЖИВИЦЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ МЕТОДОМ ЯМР

Е. Д. Скаковский^{1*}, Л. Ю. Тычинская¹, О. А. Молчанова¹, Е. И. Гапанькова¹,
И. А. Латышевич¹, С. Е. Богушевич², С. А. Ламоткин³

УДК 543.429.23:665.944.54

¹ Институт физико-органической химии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь; e-mail: sed@ifoch.bas-net.by

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³ Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

(Поступила 7 декабря 2022)

Методом ЯМР изучен состав живицы сосны обыкновенной в концентрированных и разбавленных растворах в восьмидейтерированных растворителях и CCl_4 . Установлено, что разбавленные растворы в хлороформе- d , хлористом метилене- d_2 и уксусной кислоте- d_4 содержат значительно меньше левопимаровой кислоты, чем концентрированные, при одновременном возрастании количества абетиновой кислоты. Предположено, что высокая скорость изомеризации левопимаровой кислоты в абетиновую в разбавленных растворах при комнатной температуре обусловлена катализитическими реакциями, связанными с кислотным характером растворителей, что необходимо учитывать при проведении ЯМР-анализа. При “старении” живицы идут реакции с кислородом воздуха с образованием дегидроабетиновой кислоты. Сравнительный анализ показал, что при установлении состава живицы методом ЯМР наиболее приемлемым растворителем является дейтерированный бензол.

Ключевые слова: спектр ЯМР; живица сосны обыкновенной; абетиновая, дегидроабетиновая, левопимаровая кислоты.

The NMR method has been used to study the composition of Scotch pine oleoresin in concentrated and dilute solutions in 8 deuterated solvents and carbon tetrachloride (CCl_4). It has been established that dilute solutions in chloroform- d , methylene chloride- d_2 and acetic acid- d_4 contain significantly less levopimamic acid than the concentrated ones, while the amount of abietic acid increases. It is assumed that the high rate of isomerization of levopimamic acid to abietic acid in dilute solutions at room temperature is due to catalytic reactions associated with the acidic nature of solvents, which must be taken into account when performing NMR-analysis. During the “aging” of oleoresin, reactions with atmospheric oxygen occur with the formation of dehydroabietic acid. Comparative analysis has shown that deuterated benzene is the most acceptable solvent when determining the composition of oleoresin with NMR method.

Keywords: NMR spectra; Scotch pine oleoresin; abietic, dehydroabietic, levopimamic acids.

Введение. Лес в Беларуси занимает почти 40 % ее территории. Среди лесных культур преобладает сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L., относящаяся к семейству сосновые *Pinaceae*. Древесина сосны смолиста, прочна и широко используется в строительстве. Другим важным продуктом является смола-живица, образующаяся в смоляных ходах и при подсочеке вытекающая наружу. Живица —

FEATURES OF THE ANALYSIS OF SCOTCH PINE OLEORESIN COMPOSITION WITH NMR METHOD

Е. Д. Скаковский^{1*}, Л. Ю. Тычинская¹, О. А. Молчанова¹, Е. И. Гапанькова¹, И. А. Латышевич¹,
С. Е. Богушевич², С. А. Ламоткин³ (¹ Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: sed@ifoch.bas-net.by; ² Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; ³ Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus)

ценное сырье для химической промышленности, состоящее из летучих соединений (моно- и сесквитерпенов и дитерпенов (преимущественно смоляных кислот (СК)). При перегонке с водяным паром летучие соединения отделяются с образованием скипидара, СК образуют канифоль. Из скипидара получают лаки, растворители, ароматизаторы, kleящие вещества и другие продукты. Канифоль применяется в мыловарении, бумажной, резинотехнической и лакокрасочной промышленности.

Широкий спектр использования живицы в различных областях делает обоснованным анализ ее состава с целью получения оптимальными способами продуктов с потребительскими свойствами и наилучшим подбором соединений. Большое количество работ посвящено изучению состава живицы сосны. Из используемых при этом методов наиболее известна и давно применяется газожидкостная хроматография (ГЖХ). Этим методом проанализирована живица сосны тяжелой (*P. ponderosa*) и сосны Жеффрея (*P. jeffreyi*) [1]. Однако ГЖХ-анализ не позволяет определить индивидуально левопимаровую и палюстревую кислоты, поскольку они выходят одним пиком.

Более достоверную и обширную информацию получают при совместном применении ГЖХ и масс-спектрометрии. В [2] проведен анализ живицы сосны тонкинской (*P. tonkinensis*) и сосны меркуза (*P. merkusii*). Для определения СК методом ГЖХ необходимо преобразовывать их в метиловые эфиры, что создает некоторые трудности.

Метод ЯМР позволяет анализировать живицу без предварительной пробоподготовки. Достаточно растворить ее в подходящем растворителе, в качестве которого чаще всего используется дейтерированный хлороформ (CDCl_3).

Для установления строения СК ряда пимарана и изопимарана выделены из живичной канифоли сосны обыкновенной (*P. sylvestris*) и проанализированы методом ^{13}C ЯМР в четыреххлористом углероде (CCl_4) и CDCl_3 [3]. С применением протонного магнитного резонанса изучено окисление сосновой живицы, а также ее изомеризация, полимеризация и деструкция под воздействием температуры [4]. На основе анализа живицы сосны обыкновенной методом ЯМР в CDCl_3 -растворах установлено [5], что в составе живицы из менее промышленно загрязненных районов Беларуси выше содержание левопимаровой кислоты и ниже — абиетиновой и изопимаровой кислот. Сравнительный анализ методом ЯМР компонентного состава растворов живицы сосны обыкновенной в CDCl_3 , отобранный в чистых и радиационно загрязненных территориях Беларуси, показал такую же зависимость содержания СК, как и от промышленного загрязнения [6].

В работе [7] после гидродистилляции живицы сосны обыкновенной получены бальзамы, состоящие из СК. На основании ЯМР-анализа этих СК в CDCl_3 определены химические сдвиги основных протонов и атомов углерода, позволившие идентифицировать и количественно измерить содержание СК в анализируемых бальзамах. Установлено, что наборы СК и их соотношения в бальзамах живиц, полученных из произрастающих в различных районах сосен, практически не различаются. Длительное хранение бальзамов приводит к обогащению их абиетиновой кислотой.

Метод ЯМР на ядрах ^{13}C использован при установлении состава 23 образцов живицы сосны приморской (*P. pinaster*), произрастающей на Корсике [8]. СК были предварительно отделены от нейтральных терпенов и растворены в CDCl_3 . Образцы разделены на два кластера: с большим содержанием дегидроабиетиновой кислоты и малым содержанием левопимаровой, во втором кластере преобладала левопимаровая кислота.

Таким образом, существует достаточно много публикаций, посвященных применению ЯМР-спектроскопии для анализа живицы или экстрактов различных частей сосен. Большинство исследований проведено с CDCl_3 растворами. В ряде работ указывается на большой разброс в определяемом содержании левопимаровой кислоты.

При изучении состава живицы сосен подрода *Pinus* методом ЯМР ранее нами установлено [9], что он зависит от многих факторов (вида сосны, времени и места сбора, а также условий сбора и хранения образцов). Кроме того, вследствие реакций изомеризации и окисления происходит перераспределение компонентного состава СК. Наибольшие изменения в содержании претерпевают левопимаровая, абиетиновая, палюстревая, неоабиетиновая и дегидроабиетиновая кислоты. Предположено, что содержание компонентов в составе живицы может зависеть от условий записи ЯМР-спектров.

Цель настоящей работы — ЯМР-анализ состава живицы сосны обыкновенной, проведенный в различных растворителях и при разных концентрациях исходной смолы.

Эксперимент. Живицу сосны обыкновенной собрали с дерева ~70 лет в Телеханском лесничестве в августе 2021 г. и поместили в закрытом сосуде в холодильник при температуре 10 °C. Для ЯМР-анализа использовали восемь доступных дейтерированных растворителей и CCl_4 . В 0.7 мл каж-

дого из них растворяли живицу в количестве 10 и 110 мг, за исключением циклогексана-*d*₁₂ (C₆D₁₂), в котором растворилось только 64 мг. После растворения образцы фильтровались, а спектры регистрировались на следующий день. Для разбавленных растворов проводилась запись только ¹H, а для концентрированных — как ¹H-, так и ¹³C-спектров.

Спектры ЯМР зарегистрированы на спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочими частотами 500 и 125 МГц для ядер ¹H и ¹³C, соответственно, при температуре 20 °C. Дейтронная стабилизация осуществлялась с использованием сигнала растворителя, в случае CCl₄ — сигнала C₆D₁₂, добавленного в количестве ~10 % в основной растворитель. В качестве внутреннего стандарта для ядер ¹H использован сигнал протонов не полностью дейтерированных молекул растворителей, в случае спектров на ядрах ¹³C репером служил сигнал самого растворителя. Протонные спектры регистрировали в “количественном” режиме с использованием 30° импульса, а углеродные — 60°. Релаксационная задержка 5 с в обоих случаях. Для идентификации соединений в идентичных условиях предварительно зарегистрированы спектры ¹H и ¹³C предполагаемых СК и других терпенов. Левопимаровая кислота выделена из живицы сосны обыкновенной в 2007 г., содержание основного компонента 92 %, хранилась в закрытой посуде при комнатной температуре. Спектр левопимаровой кислоты в CDCl₃ (5 мг в растворе) записывался дважды: через сутки и через 8 сут после растворения. Раствор сохранялся при комнатной температуре.

Количество накоплений для спектров ¹H составляло 256, для спектров ¹³C (регистрировали с давлением протонного взаимодействия) 1024. Спектры на ядрах ¹³C необходимы для более полной идентификации компонентов живицы.

Экспериментальные данные получены и обработаны с помощью пакета программ XWIN-NMR 3.5. Количественные расчеты проведены на основании интегральных интенсивностей сигналов соответствующих соединений в ¹H ЯМР-спектрах. Относительная ошибка измерений ~4 %.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 показаны фрагменты ¹H ЯМР-спектров растворов в CDCl₃ живицы сосны обыкновенной малой и большой концентраций. Идентифицированы восемь СК: абietиновая (1), дегидроабетиновая (2), изопимаровая (3), левопимаровая (4), неоабетиновая (5), палюстровая (6), пимаровая (7) и сандаракопимаровая (8), а также шесть монотерпенов: камfen (9), Δ³-карен (10), лимонен (11), мирцен (12), α-пинен (13) и β-пинен (14). Обнаружены незначительные количества дегидроабиетала (15). На рисунках цифрами обозначены ароматические, олефиновые и альдегидный протоны соответствующих соединений.

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР дано в работах [7, 10—13]. Практически все идентифицированные соединения имеют неперекрывающиеся сигналы в области альдегидных, ароматических и олефиновых протонов. Это позволило количественно определить присутствующие соединения на основании интегральных интенсивностей линий. Полученные данные (табл. 1) демонстрируют, что содержания компонентов живицы в CDCl₃ сильно различаются для разных концентраций. Так, левопимаровая кислота практически отсутствует в растворе 10 мг живицы, но ее количество составляет 19.9 % в образце, содержащем 110 мг живицы. Спектры зарегистрированы в один день. Одновременно с резким уменьшением содержания левопимаровой кислоты при разбавлении увеличивается количество в растворе абетиновой кислоты (36.3 % против 13.8 %). Такое изменение в содержании компонентов живицы характерно при ее нагревании.

Ранее была изучена термическая изомеризация левопимаровой кислоты в твердом состоянии в интервале температур 80—170 °C [11]. Обнаружено, что в этих условиях образуются абетиновая, неоабетиновая и палюстровая кислоты. Присутствие кислорода дает также дегидроабетиновую кислоту. Кроме того, существует минорный процесс, приводящий к незначительным количествам пимаровой кислоты. Повышение температуры ускоряет реакции изомеризации. Однако образец левопимаровой кислоты, 15 лет хранившийся в открытом состоянии при комнатной температуре, полностью разложился.

Эти наблюдения побудили проверить поведение левопимаровой кислоты в растворе (5 мг в 0.7 мл CDCl₃). На рис. 2 показаны фрагменты ¹H ЯМР-спектров, зарегистрированных через 1 и 8 сут после приготовления раствора и хранения его при комнатной температуре. В первом случае наблюдается следующее содержание СК (мол. %): абетиновая 10.1, дегидроабетиновая 2.9, левопимаровая 72.5, неоабетиновая 2.2 и палюстровая 10.1. Во втором случае отсутствует исходная левопимаровая кислота, а содержание остальных СК следующее (мол. %): абетиновая 45.0, дегидроабетиновая 6.7, неоабетиновая 5.5 и палюстровая 40.8. Таким образом, растворенная в CDCl₃ левопимаровая кислота при комнатной температуре эффективно изомеризуется в абетиновую и палюстровую кислоты и

дает незначительные количества неоабиетиновой. Дегидроабиетиновая кислота, по-видимому, получается в реакции диспропорционирования с кислородом воздуха. Можно предположить, что высокие скорости изомеризации при комнатной температуре обусловлены каталитическими реакциями, например кислотным катализом (вследствие электроноакцепторного действия трех атомов хлора хлороформ является весьма сильной СН кислотой).

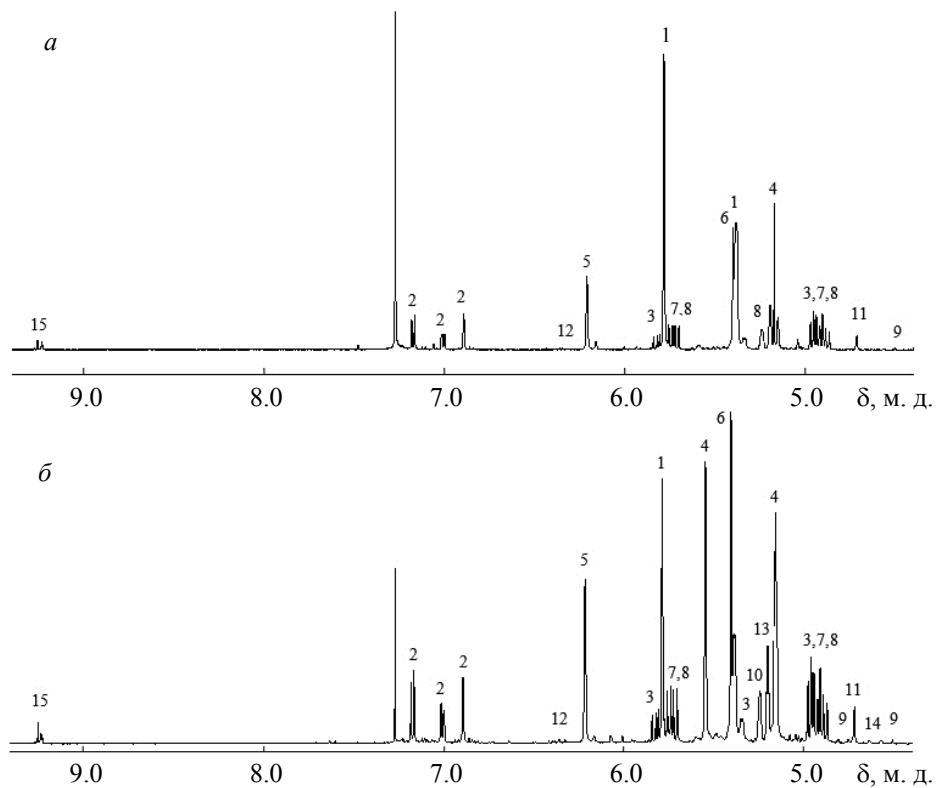


Рис. 1. Фрагменты ^1H ЯМР-спектров растворов живицы в CDCl_3 : в растворе 10 (а) и 110 мг (б) живицы

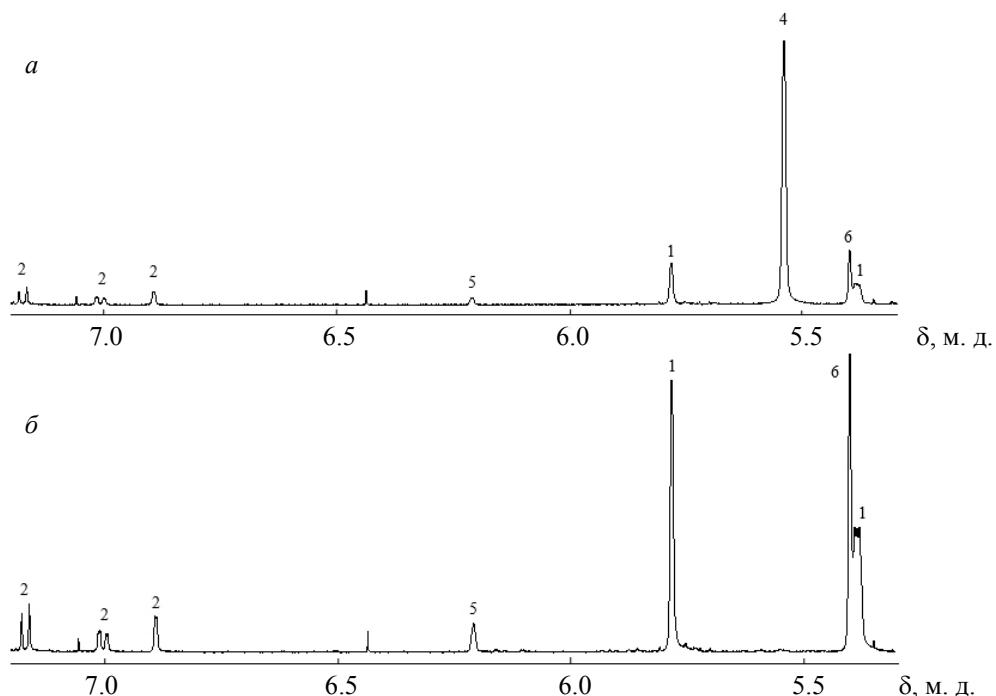


Рис. 2. Фрагменты ^1H ЯМР-спектров раствора 5 мг левопимаровой кислоты в CDCl_3 через 1 (а) и 8 сут (б) после приготовления раствора

Т а б л и ц а 1. Содержание компонентов живицы сосны обыкновенной в различных растворителях (мол. %)

№	Соединение	CDCl ₃		CD ₃ C(O)OD		CD ₃ C(O)CD ₃		C ₆ D ₆		CCl ₄		C ₆ D ₁₂		CD ₂ Cl ₂		DMSO-d ₆		CD ₃ OD		
		Количество живицы в растворе, мг																		
		10	110	10	110	10	110	10	110	10	110	10	64	10	110	10	110	10	110	
<i>Кислоты</i>																				
1	Абииетиновая	36.3	13.8	15.8	15.3	7.2	8.0	8.6	8.7	9.0	8.3	8.6	8.5	10.2	8.9	8.4	8.8	8.0	8.0	
2	Дегидроабиетиновая	4.6	4.3	7.7	7.8	10.8	7.3	5.0	5.8	3.8	4.2	7.5	7.3	7.6	7.2	7.5	7.2	6.8	6.5	
3	Изопимаровая	4.4	4.3	4.3	4.7	5.6	5.1	4.0	4.5	4.3	4.5	4.4	5.1	5.1	4.9	5.2	4.6	5.3	5.5	
4	Левопимаровая	0.2	19.9	11.0	15.3	16.1	21.1	28.1	28.1	27.8	27.9	19.4	19.4	15.8	22.2	22.1	24.1	19.2	20.9	
5	Неоабиетиновая	11.0	11.7	6.3	7.5	6.8	7.3	9.5	9.4	10.1	10.1	7.0	7.2	6.9	8.0	8.0	9.1	7.5	7.8	
6	Палюстровая	16.5	17.2	11.7	12.9	12.6	13.4	12.6	13.0	15.1	16.0	12.8	13.1	14.5	13.9	13.7	12.9	12.4	12.3	
7	Пимаровая	7.0	7.5	7.8	8.1	9.7	10.3	6.5	6.5	7.8	8.0	9.0	8.7	9.9	9.2	9.0	8.6	8.7	8.3	
8	Сандаракопимаровая	2.0	2.1	1.2	1.3	0.9	1.4	1.8	1.9	1.4	1.5	1.3	1.4	1.7	1.6	1.7	1.5	1.7	1.8	
<i>Монотерпены</i>																				
9	Камfen	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
10	Δ ³ -карен	4.3	4.5	4.3	4.1	6.1	6.2	7.5	7.5	4.3	4.5	6.0	6.6	7.6	6.3	5.7	5.0	8.5	7.3	
11	Лимонен	0.9	1.0	0.8	0.9	0.9	1.5	0.2	0.2	0.9	0.9	1.3	1.5	1.1	0.9	1.0	0.9	2.0	2.2	
12	Мирцен	0.5	0.7	0.1	0.1	0.4	0.5	0.1	0.1	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	
13	α-Пинен	9.1	9.4	7.0	8.5	10.4	10.2	8.7	8.0	7.2	5.9	13.5	13.1	10.4	7.7	8.6	8.2	10.6	10.4	
14	β-Пинен	0.3	0.3	0.1	0.2	0.5	1.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
<i>Альдегид</i>																				
15	Дегидроабиеталь	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	

Из доступных дейтерированных органических кислот использована уксусная-d₄. Действительно, при разбавлении раствора живицы содержание левопимаровой кислоты незначительно уменьшается (с 15.3 до 11.0 %). Однако это практически не сказывается на относительном содержании каких-либо СК, в том числе абииетиновой, хотя ее в обоих случаях становится больше. По-видимому, в данном случае концентрация не важна для изомеризации.

Уменьшение содержания левопимаровой кислоты и увеличение концентрации абииетиновой при разбавлении, но в значительно меньших пропорциях наблюдается и в хлористом метилене (CD₂Cl₂). Меньшее ее количество определяется и при разбавлении раствора в ацетоне-d₆ (CD₃C(O)CD₃), но обусловлено это не изомеризацией, а диспропорционированием с кислородом, поскольку фиксируется рост содержания дегидроабииетиновой кислоты. В остальных растворителях содержание левопимаровой кислоты не зависит от концентрации живицы, а наибольшее ее количество содержится в дейтерированном бензole C₆D₆ (28.1 %) и CCl₄ (27.9 %). Это количество, по-видимому, и продуцирует сосна обыкновенная.

Кроме изомеризации в растворах живицы из-за большого количества соединений с двойными связями протекают реакции полимеризации, окисления и диспропорционирования. Наиболее заметна реакция с кислородом, вследствие которой образуется дегидроабииетиновая кислота.

Одним из наиболее инертных растворителей является циклогексан-d₁₂. Однако оказалось, что живица в нем плохо растворяется. В конечном итоге в растворе увеличивается относительное количество монотерпенов (особенно α-пинена), лучше растворимых, чем СК. В диметилсульфоксиде-d₆ (DMSO-d₆) разбавление приводит к незначительному уменьшению содержания левопимаровой кислоты, но в отличие от CDCl₃ несколько увеличивается доля палюстровой, а не абииетиновой кислоты. Кроме того, DMSO в процессе хранения интенсивно поглощает атмосферную воду, что загрязняет ¹H-спектр раствора живицы и ухудшает ее растворимость. Это делает DMSO-d₆ не самым удобным растворителем для анализа.

Метанол-d₄ (CD₃OD) в качестве растворителя дает результаты, мало зависящие от концентрации живицы. Однако сигналы остаточных протонов гидроксила и растворенной воды закрывают область спектра, удобную для анализа, что делает этот растворитель не совсем удобным для исследования состава живицы.

Наиболее достоверную информацию о составе вырабатываемой сосновой живицы, на наш взгляд, дает изучение ЯМР-спектров растворов в CCl_4 и C_6D_6 . Ранее CCl_4 широко использовался в ЯМР-спектроскопии. Однако для рутинной записи спектров на ЯМР-Фурье-спектрометрах необходимы дейтерированные растворители для осуществления стабилизации магнитного поля. Поэтому в случае использования в качестве растворителя CCl_4 возникают неудобства. Таким образом, из рассмотренных девяти растворителей C_6D_6 наиболее приемлем при анализе состава живицы сосны обыкновенной методом ЯМР. Использование одного из наиболее применяемых в ЯМР растворителей CDCl_3 дает результаты, близкие к реальному содержанию левопимаровой и других смоляных кислот, только в случае большой концентрации живицы.

Заключение. В ходе исследования методом ЯМР высокого разрешения состава живицы сосны обыкновенной, растворенной в различных растворителях, показано, что результаты могут сильно различаться из-за протекания в растворах реакций при комнатной температуре. Главной при этом является реакция изомеризации левопимаровой кислоты с образованием абиетиновой и пальюстровой кислот. Реакции с кислородом воздуха с образованием дегидроабиетиновой кислоты протекают в меньшей степени. Данный процесс характерен и при “старении” живицы. Сравнительный анализ показал, что для установления методом ЯМР количественного состава компонентов живицы, продуцируемой сосной обыкновенной, наиболее приемлемым растворителем является C_6D_6 .

- [1] A. B. Anderson, R. Riffer, A. Wong. *Phytochemistry*, **8** (1969) 873—875
- [2] W. Lange, G. Weipmann. *Holz als Roh- und Werkstoff*, **45**, № 7 (1987) 285—288
- [3] И. И. Бардышев, А. С. Дегтяренко, Т. И. Пехк, Г. С. Янковская. *ЖОрХ*, **17**, № 12 (1981) 2568—2573
- [4] В. Ю. Пузанова, Б. А. Радбиль, В. А. Ралдугин, В. А. Пентегова. *Химия древесины*, № 4 (1983) 12—14
- [5] С. И. Шпак, С. А. Ламоткин, А. И. Ламоткин, Е. Д. Скаковский. Сб. ст. XIII Всерос. конф. “Структура и динамика молекулярных систем”, 25 июня—1 июля, Яльчик, Уфа—Казань—Москва—Йошкар-Ола, **2** (2006) 455—458
- [6] С. И. Шпак, С. А. Ламоткин, А. И. Ламоткин, Е. Д. Скаковский. Тр. БГТУ, № 14 (2006) 165—169
- [7] Е. Д. Скаковский, Л. Ю. Тычинская, О. А. Гайдукевич, Н. Г. Козлов, А. Ю. Клюев, С. А. Ламоткин, С. И. Шпак, С. В. Рыков. *Журн. прикл. спектр.*, **75**, № 3 (2008) 411—415
[E. D. Skakovskii, L. Yu. Tychinskaya, O. A. Gaidukovich, N. G. Kozlov, A. Yu. Klyuev, S. A. Lamotkin, S. I. Shpak, S. V. Rykov. *J. Appl. Spectr.*, **75** (2008) 439—443]
- [8] J. Ottavioli, M. Paoli, J. Casanova, F. Tomi, A. Bighelli. *Chem. Biodiversity*, **16** (2019) e1800482, doi: 10.1002/cbdv.201800482
- [9] Е. Д. Скаковский, Л. Ю. Тычинская, Е. А. Гапанькова, И. А. Латышевич, А. Г. Шутова, С. Н. Шиш, С. А. Ламоткин. *Изв. Санкт-Петербург. лесотех. академии*, вып. 237 (2021) 242—257
- [10] A. Koutsaviti, E. Ioannou, M. Couladis, O. Izakou, V. Roussis. *Magn. Res. Chem.*, **55**, N 8 (2017) 772—778
- [11] Е. Д. Скаковский, Л. Ю. Тычинская, О. А. Гайдукевич, А. Ю. Клюев, С. А. Ламоткин, С. И. Шпак, С. В. Рыков. Сб. ст. XV Всерос. конф. “Структура и динамика молекулярных систем”, 30 июня—4 июля, Яльчик, Казань, **3** (2008) 172—175
- [12] N. Muto, T. Tomokuni, M. Haramoto, H. Tatemoto, T. Nakanishi, Y. Inatomi, H. Murata, A. Inada. *Biochem.*, **72**, N 2 (2008) 477—484
- [13] Е. Д. Скаковский, С. А. Ламоткин, Л. Ю. Тычинская, О. А. Молчанова, С. В. Матвейчук, Ю. М. Сорокина. Тр. БГТУ, № 4 (2014) 211—215