

Kuusen pihkan etanoliuuton optimointi

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Soveltavan kemian osasto

24.01.2018

Pirjo Kosonen

Tiivistelmä

Kuusessa on muutakin hyödynnettävää kuin paperin ja kartongin valmistukseen tarvittava raaka-aine. Mielenkiinto on kohdistunut etenkin puun sisältämiin yhdisteisiin, joilla on havaittu olevan suotuisia terveydellisiä vaikutuksia. Tällainen on kuusen pihka, joka on useamman yhdisteen seos. Kuusen eri osien sisältämien yhdisteiden tutkimus on yhä ajankohtaisempaa. Esimerkiksi niin kuusesta kuin männystä saatavia antibiootteja tutkitaan Itä-Suomen yliopistossa.

Repolar Pharmaceuticals Oy perustettiin vuonna 2006 pihkavalmisteen tuotannon aloittamiseksi. Idea saatiin kotitekoisesta pihkasalvasta, jota yleisesti käytettiin Lapissa haavojen hoitoon. Repolar Pharmaceuticalsin tilaaman työn aiheena oli parantaa kuusen pihkan etanoliuuttomenetelmää. Nykyistä etanoliuuttotapaa haluttiin optimoida erilaisten parametrien avulla.

Kirjallisessa osassa paneuduttiin kuusen pihkan koostumukseen, sen prosessointiin ja analytiikkaan.

Luottamuksellisessa kokeellisessa osassa kyettiin löytämään tapoja, jotka paransivat saantoa ja nopeuttivat uuttoa. Pihka käsiteltiin pienentämällä raekokoa. Uuttoliuksena oli etanoli. Tutkittavia tekijöitä olivat pihkan määrä verrattuna liuottimen määrään, liotus, ravistelu ja lämpötilan kohottaminen. Pihkaa uutettiin myös Soxhlet-uuttolaitteella. Tarkoituksena oli siis vertailla saantoja ja eri yhdisteiden uuttumista kuusen pihkasta ajan funktiona. Näytteet tutkittiin kaasukromatografisesti käyttäen liekki-ionisaatiodektoria ja massaspektrometriä. Lisäksi määritettiin haihdutusjäännös- ja uuttoprosentti. Vertailunäytteenä tehtiin asetoniuutto, jonka tuloksia verrattiin muihin uuttotuloksiin.

Esipuhe

Työ on tehty Jyväskylän yliopistossa 1.3.2014 – 1.12.2017 Repolar Pharmaceuticals Oy:lle. Artikkelit on kerätty hakukoneiden Google, Google Scholarin, ResearchGaten ja varsinkin Scifinderin avulla. Soveltavan kemian osastolta ohjaajina toimivat yliassistentti Hannu Pakkanen ja professori Raimo Alén. Erinomaisia neuvoja antoi myös laboratoriomestari Marja Salo. Repolar Pharmaceuticals Oy:n puolesta ohjaajana toimi Hanna Kumpulainen. Työtäni kommentoivat myös Pentti Sipponen, Kyösti Vanha ja Miika Jokinen. Kiitän tuhannesti kaikkia edellä mainittuja.

Kiitän perhettäni, Hannua, Lauria ja Petriä, jotka ovat kannustaneet ja tukeneet niin monin tavoin. Erityiset kiitokset menevät fysioterapeutti Sini Kemppaiselle.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	i
Esipuhe.....	ii
Sisällysluettelo	iii
Lyhenteet.....	v
1 Johdanto.....	1
2 Kuusi.....	2
2.1 Kuusen pihka.....	3
2.1.1 Isoprenoidit ja terpeenit	5
2.1.2 Terpeenisynteesi	7
2.2 Kuusen pihkan koostumus	8
2.2.1 Fysiologinen pihka.....	9
2.2.2 Patologinen pihka.....	9
2.2.3 Kalluspihka	10
2.3 Terpeenit ja terpenoidit	10
2.3.1 Monoterpeenit ja -terpenoidit	10
2.3.2 Seskviterpeenit ja -terpenoidit	13
2.3.3 Diterpeenit ja -terpenoidit.....	15
2.3.4 Triterpeenit, triterpenoidit ja sterolit.....	18
2.4 Rasvat ja vahat	19
2.5 Fenolit ja polyfenolit.....	20
3 Kuusen pihkan etanoliuutteen koostumus	24
3.1 Hartsihapot.....	25
3.2 Hartsihappojen hajoaminen ja hapettuminen.....	33
3.3 Hartsihapot sulfaattisellutehtaan mustalipeässä ja prosessivesissä.....	35
3.4 Lignaanit	38
3.4.1 Pinoresinoli	41

3.4.2	Larisiresinoli	41
3.4.3	Sekoisolarisiresinoli	42
3.4.4	Larisiresinolikumaraatti	43
3.5	Hydroksikanelihapot	44
4	Kuusen pihkan prosessointi	46
4.1	Etanoli	46
4.1.1	Etanoli-vesiseoksen viskositeetti	46
4.1.2	Etanoli-vesiseoksen polaarisuus	48
4.1.3	Etanoli-vesiseoksen kemiallisia reaktioita	49
4.2	Muita liuottimia	51
4.3	Kiinteän aineen uutto	52
4.4	Massan siirto kiinteän aineen uuttoprosesseissa	54
4.5	Kiinteän aineen uuttolaitteistot	56
4.5.1	Soxhlet -uutto	57
4.5.2	Soxtec -uutto	58
4.5.3	Nopeutettu liuotinuutto	59
4.5.4	Ylikriittinen uutto	61
5	Analytiikka	63
5.1	Kaasukromatografia	63
5.1.1	Kaasukromatografi–liekki-ionisaatiodetektorit	63
5.1.2	Kaasukromatografi–massaspektrometri	65
5.1.3	Pyrolyysi–kaasukromatografi–massaspektrometri	65
5.2	Nestekromatografia	66
5.2.1	Ohutlevykromatografia	66
5.2.2	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	67
6	Yhteenveto	70
7	Kirjallisuusviiteluettelo	71

Lyhenteet

[α] _D	Ominaiskiertokyky, jossa alaindeksi D tarkoittaa 589 nm aallonpituutta
Aa	Absolutoitu etanoli
APCI	Kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa
APPI	Fotoionisaatio ilmanpaineessa
ASE	Nopeutettu liuotinuutto
BFC	Biokertyvyyskerroin
BSTFA	N,O-bis(trimetyylisilyyli)-trifluoroasetamidi
CI	Kemiallinen ionisaatio
CLP-asetus	Kemikaalien luokitusta, merkintöjä ja pakkaamista koskeva asetus
CoA	Koentsyymi A
CYP450	Sytokromi P450 mono-oksygenaasi
Da	Dalton, molekyyli­massan yksikkö
DAD	Diodirividetk­tori
DEHP	Di(2-etyyliheksyyli)ftalaatti
EI	Elektroni-ionisaatio
EMRSA	Epidemisesti metisilliini­resistentti <i>Staphylococcus aureus</i> -kanta
ESI	Sähkösumutusionisaatio
FID	Liekki-ionisaatiodek­tori
FPP	Farnesyylipyrofosfaatti
GC	Kaasukromatografi
GPP	Geranyylipyrofosfaatti
GC-FID	Liekki-ionisaatiodek­torilla varustettu kaasukromatografi
GC-MS	Kaasukromatografi, jonka detektorina toimii massaspektrometri

HMDS	Heksametyylidisilatsaani
HPLC	Korkean erotuskyvyn kromatografi
IC ₅₀	Pitoisuus, joka estää 50 prosenttia soluaktiivisuudesta.
IgM	immunoglobuliini M
K _{ow}	Oktanoli-vesi jakosuhte
LPP	Linalyylipyrofosfaatti
MDR	Monille lääkkeille resistentti
MRSA	Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i> -kanta
MS	Massaspektrometri
MS/MS	Tandemmassaspektrometria
NADP ⁺	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti
NADPH	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin pelkistynyt muoto
NAD ⁺	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
NADH	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin pelkistynyt muoto
NMR	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
NPP	Neryylipyrofosfaatti
OPP	Difosfaattiryhmä
PDA	Valodiodirividetektor
pK _a	Happodissosiaatiovakio
PP	Difosfaattiryhmä
Py	Pyrolyysi
RNA	Ribonukleinihappo
RP	Käänteisfaasi
SFE	Ylikriittinen uutto
TAPPI	Technical Association of Pulp and Paper Industry

TLC	Ohutlevykromatografia
TMCS	Trimetyylikloorisilaani
tRNA	Siirtäjä-RNA
UV	Ultravioletti

.

1 Johdanto

Kuusen pihkaa on perinteisesti käytetty moneen tarkoitukseen. Kuusen pihka on vanha lääkinnällinen aine, jota on käytetty monenlaisten ihovaurioiden ja -tulehdusten hoitoon.¹ Reumatismia, noidannuolta ja kroonista keuhkoputkentulehdusta on lievitetty pihkalaastareilla, joissa pihkaan on sekoitettu lampaantalia, kamferia ja anista.² Lapissa on hoidettu haavoja kotitekoisella pihkasalvalla.³ Valko-Venäjällä pihkaa on käytetty sekoitettuna mehiläisvahan, hunajan ja auringonkukkaöljyn kanssa hiertymiin.² Pohjois-Amerikassa intiaanit ovat käyttäneet valko- ja sitkankuusta vastaavanlaisiin tarkoituksiin.²

Antibioottiresistentit bakteerit ovat lisääntyneet, ja ratkaisuja ongelmaan haetaan myös havupuiden pihkasta. Esimerkiksi Virpi Virjamo tutkimusryhmineen tutkii niin kuusesta kuin männystäkin saatavia antibiootteja Itä-Suomen yliopistossa.⁴

Repolar Pharmaceuticals perustettiin vuonna 2006 pihkavalmisteiden tuotannon aloittamiseksi. Idea saatiin kotitekoisesta pihkasalvasta, jota yleisesti käytettiin Lapissa haavojen hoitoon.³ Repolar Pharmaceuticalsin tilaaman opinnäytetyön aiheena oli parantaa kuusen pihkan etanoliuuttomenetelmää.

Kirjallisessa osassa paneuduttiin kuusen pihkan koostumukseen, sen prosessointiin ja analytiikkaan. Kokeellisessa osassa pihkan nykyisen uuttotavan kehittämistä tutkittiin, ja erilaisten parametrien avulla optimoitiin etanoliuuttoa. Testimenetelmiä olivat lämpötilan kohottaminen, liotus, ravistelu ja Soxhlet-uutto. Testattiin myös pihkan raekoon vaikutusta uuttoon. Optimaalista suhdetta pihkan ja etanolin määrän välillä etsittiin. Lisäksi tutkittiin lämpötilan kohottamisen ja ravistelun vaikutusta uuttoon. Tutkittiin myös kiehuvan etanolin vaikutusta pihkaan Soxhlet-uuton avulla. Kaiken tämän lisäksi pihkaa liotettiin etanolissa eri pihka-etanolisuhteissa. Verrattiin myös etanoliuuton tuloksia asetoniuuttoon. Lopuksi eri testausmenetelmien tuloksia vertailtiin toisiinsa. Edellä mainitut tutkimukset analysoitiin liekki-ionisaatiodetektorilla varustetulla kaasukromatografilla (GC-FID) ja kaasukromatografilla, jonka detektorina toimi massaspektrometri. (GC-MS).

2 Kuusi

Kuusi (*Picea abies*) on yksi yleisimmistä puulajeistamme.⁵ Tämä voidaan tunnistaa neulasten tummanvihreästä väristä ja ylöspäin kapenevasta latvuksesta. Kuusen olemus on hoikka, rungoltaan suora ja juuristoltaan pinnanmyötäinen puu. Levinneisyys Suomessa on lähes koko maa pohjoisimpia osia lukuun ottamatta. Itä-länsisuunnassa kuusi on levinnyt Keski-Euroopasta Amurin ja Altain alueelle. Kasvupaikojen tulisi olla mielellään hedelmällisiä, mutta myös kuusi kasvaa myös karuilla mailla. Se on vallitseva laji tuoreilla ja lehtomaisilla kankailla.

Etelä-Suomessa kuusen suvullinen lisääntyminen on kohtalaista, sillä kuusi tuottaa siemeniä runsaasti joka 4.–5. vuosi, kun taas Pohjois-Suomessa hyvät siemenvuodet ovat harvemmassa.⁵ Suvuton lisääntyminen on kuuselle myös mahdollista. Taimien kitukasvuisuus on tyypillistä ensimmäisinä vuosina, jonka jälkeen kasvu nopeutuu. Tilavuutta kuusi ei kasva enää 60–70 vuotiaina. Kuusi sietää hyvin varjoa. Kuusella on lukuisia tuhohyönteisiä, lahottajasieniä ja sienitauteja, jotka vaurioittavat siemeniä, neulasia ja puuainetta. Lisäksi se on myös hallalle arka.

Suomen metsistä noin neljäsosa koostuu kuusista.⁶ Kuusi jakautuu Suomessa kahteen alalajiin, joista euroopankuusi, *picea abies* ssp. *abies*, on vallalla Etelä-Suomessa ja siperiankuusi, *picea abies* ssp. *obovata*, Pohjois-Suomessa. Se on euroopankuusta lyhytkasvaisempi (enintään 20 m), kapeampi ja pienikäyisempi. Näiden kahden kuusilajin risteytymät ovat yleisiä. Kuusta hyödynnetään metsätaloudellisesti huomattavasti ja yli 40 prosenttia kotimaisen raakapuun kokonaiskäytöstä on kuusta.⁵

2.1 Kuusen pihka

Jean H. Langenheimin⁷ mukaan kasvin pihka määritellään rasvaliukoiseksi seokseksi haihtuvia ja haihtumattomia terpenoideja ja/tai fenolisia sekundäärisiä yhdisteitä, jotka eritetään erityisistä rakenteista, jotka sijaitsevat joka kasvin sisällä tai pinnassa ja näillä yhdisteillä on merkitystä ekologisissa vuorovaikutuksissa.⁷ Kuvassa 1 voidaan nähdä vahingoittuneen puun pihkan muodostusta.



Kuva 1. Kuusen pihkaa. Pirkkala 2016.

Etupäässä pihkat koostuvat sekundäärisistä aineenvaihduntatuotteista, jotka eivät osallistu kasvin pääasialliseen aineenvaihduntaan.⁷ Lisäksi ne muodostuvat esiasteeksi ja varastoituvat kasvin rakenteisiin, mutta pihkaa voi syntyä vaurioituneelle alueelle ilman pihkan muodostukseen tarvittavaa konstruktiota. Pihkaa kehittyy pääasiassa puumaisissa siemenkasveissa.

Sekundääriset aineenvaihduntatuotteet ovat tyypillisiä hiilihydraattiaineenvaihdunnasta palorypälehapon ja asetyyli-CoA:n kautta syntyviä kemiallisia aineita ja aineryhmiä.⁸ Ne ovat arvokkaita eritoten kasveille, sillä niillä on oma vaikutuksensa kasvien kehitykseen, kasvien vedensaannin hallintaan ja kylmänkestävyyteen. Suuri merkitys näillä on kasvitautien ja tuholaisien torjunnassa. Kasvien sekundäärimetaboliitit toimivat muun muassa haju- ja värihoukutteina pölytyksestä huolehtiville hyönteisille ja siten huolehtivat kasvin lisääntymisestä ja lajin säilymisestä. Nämä aineenvaihduntatuotteet toimivat myös jossain tapauksissa ravintona niin ihmisille kuin eläimille. Ne voivat myös säädellä hapetus-pelkistysreaktioita ja suojata kasveja samalla tavoin kuin esimerkiksi vitamiinit ja antioksidantit.

Kuuselle sekundääriset metaboliitit ovat virustautien, tuholaisien ja sienten torjuntakeinoja.⁹ Puun haavoituttua kasvukauden aikana alkaa aksiaalisten haavapihkatiehyiden muodostuminen. Tiehyet alkavat tuottaa pihkaa noin 3-4 viikkoa puun vaurioitumisesta. Siten vauriokohta suojataan pihkalla, kunnes puun vuotuinen kasvu peittää vaurion.

Pihkatiehyitä voi sijaita ydinsäteissä, jotka ovat niin rungon kuin poikkileikkauksen suuntaisia solujen välisiä pihkaa kuljettavia kanavia.^{10,11} Ydinsäteet ovat yleensä leveydeltään yksi solurivi ja korkeudeltaan noin 1-20 solun muodostelma. Ne mahdollistavat ravinteiden varastoinnin ja kuljetuksen puun poikkisuunnassa. Pihkatiehyet kehittyvät jo valmiiseen puusoluksoon. Pihkatiehyiden muotoutuessa tylppysolut irtoavat toisistaan pitkin välilamellia. Tällöin ydinsäteiden soluista kehkeytyy epiteelisoluja. Epiteelisolut ovat elossa pintapuussa, mutta kun sydänpuun alkaa kehittyä, ne kuolevat. Epiteelisolujen erittämä pihka on paineellisessa pihkatiehyessä, etenkin pintapuun tiehyissä, mikä edistää pihkan kulkeutumista puun vauriokohtiin.

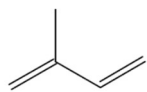
Paitsi ydinsäteiden pihkatiehyissä ja parenkyymisoluiissa, pihkaa tai täsmällisemmin uuteaineita, voi olla sydänpuussa, kuoressa, sisäöksissä ja juurissa.¹¹ Pihkan koostumus ja määrä vaihtelevat sijaintinsa mukaan. Puun olennaisimmat uuteaineryhmät ja niiden sijainnit voidaan nähdä kuvasta 2.

Puun uuteaineet			
Sydänpuu	Kuori	Pihkatiehyet	Parenkymisolut
Fenoliset yhdisteet	Fenoliset yhdisteet	Terpenoidit	Rasvat, vahat
Rasvahapot	Terpenoidit		Rasvahapot jne.
	Vahat		

Kuva 2. Puun olennaisimmat uuteaineryhmät ja niiden sijainnit.¹¹

2.1.1 Isoprenoidit ja terpeenit

Isoprenoidit ovat tyypillisiä yhdisteitä niin kasveissa kuin eläinkunnassakin, ja niiden perusrakennusosana toimii 2-metyyli-1,3-butadieeni eli isopreeniyksikkö, kuten esitetään kuvassa 3.⁸ Nämä viisihiiliset esiasteet ovat lähtöaineita erilaisten reaktioprosessien kuten polymeroitumisten, hapetus-pelkistysreaktioiden, sykliisaatioiden ja erilaisten toisiintumisten avulla lukuisille terpeeni- ja terpenoidiryhmille.



Kuva 3. Isopreeniyksikkö eli 2-metyyli-1,3-butadieeni.

Isoprenoideja on havaittu haihtuvissa öljyissä, palseissa ja hartseissa.⁸ Isopreenijohdannaisia ovat myöskin sterolit ja steroidit, karotenoidit, A-, E-, K- ja D-vitamiinit, kuten myös ubi- ja plastokinonit, steroidihormonit ja sappihapot. Alkaloidit, kumariinit ja flavonoidit sisältävät isopreenejä rakenneosinaan.

Terpeniyhdisteet syntyvät pää-häntä-kondensaatiolla määrältään vaihtelevista isopreeniyksiköistä.⁸ Isopreenisäännön mukaan jokaisessa terpeeniryhmässä yhdisteet muodostuvat samasta prekursorista, isopreenistä syklistoitumis- ja toisiintumisreaktioilla. Isoprenoidit erotellaan yleensä molekyyllissä olevien isopreeniyksikköjen määrän mukaan alaryhmiin. Näiden ryhmien sisällä rakenneosat jaetaan renkaiden lukumäärän ja hapetusasteen mukaan omiksi luokikseen, kuten voidaan nähdä taulukosta 1.

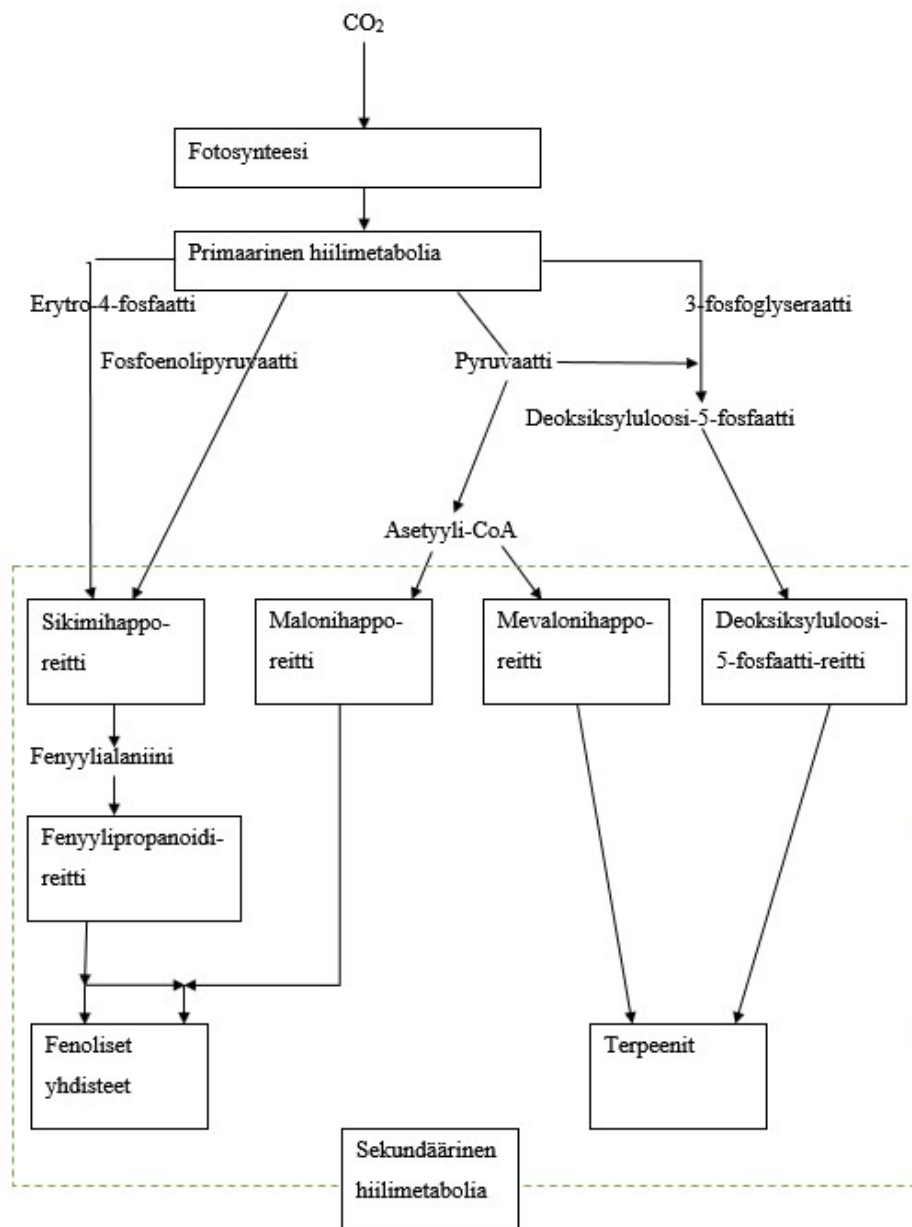
Taulukko 1. Isoprenoidiryhmät⁸

Isopreeniyksiköiden lukumäärä	Isoprenoidiryhmä	Hiilien lukumäärä
1	hemiterpeenit	5
2	monoterpeenit	10
3	seskviterpeenit	15
4	diterpeenit	20
5	sesterterpeenit	25
6	triterpeenit	30
8	tetraterpeenit eli karotenoidit	40
n	polyterpeenit	5*n

Eräät isoprenoidit esiintyvät solujen konstruktoissa rakenne-elementteinä. Esimerkkeinä näistä ovat karotenoidit, sterolit ja prennylilipidit.⁸ Pääasiassa pienemmät terpeenit houkuttelevat hyönteisiä kasveihin, osa taas karkottaa niitä. Eläimillä esiintyviä luontaisia isoprenoideja ovat rasvaliukoiset vitamiinit, ubikinonit, steroidit, kolesteroli ja steroidihormonit sekä kolesterolista kehittyneet sappihapot. Myös eräissä eläinproteiineissa on rakenneosina isopreeniyksikköjä (isopentenyli-tRNA eli isopentenyyliryhmän sisältävä siirtäjä-ribonukleinihappo ja isopreeniproteiinit). Isoprenoidiryhmien yhdisteet saattavat olla hiilivetyjä, alkoholeja, aldehydejä, ketoneja, oksideja, happoja ja estereitä. Konstruktoita on useita, muun muassa asyklisiä, mono-, di-, tri- ja tetrasyklisiä rakenteita.

2.1.2 Terpenisynteesi

Pihkakomponentit ovat peräisin fotosynteettisesti tuotetuista hiilihydraateista, jotka pilkkoutuvat pienemmiksi yhdisteiksi, kuten kuvasta 4 voidaan havaita.⁷ Terpenoidit ja fenoliset yhdisteet syntetisoituvat erilaisten aineenvaihdunnallisten polkujen kautta.



Kuva 4. Yleistetty kaavio pihkojen terpeenien ja fenolien sekundäärisistä yhdisteistä.⁷ Kaaviossa on myös kuvattu kytkökset primäärisiin yhdisteisiin ja prosesseihin.

Terpeenisynteesiin tarvitaan kymmeniä entsyymejä, syklaaseja.⁷ Nämä entsyymit katalysoivat terpenoidien syklisen rakenteen. Keelingin *et al.*¹² mukaan *picea*-suvulla on genomissaan 69 terpeenisyntaasia.¹² Terpeenisyntaasit muodostavat ensiksi hyvin reaktiivisen substraattikarbokationin, joka nopeasti muuntuu erilaisiksi karbokationivälituotteiksi.¹³ Erilaisten terpenoidisyntaasien kyky tuottaa tiettyjä reaktiotuotteita vaihtelee ja ensisijaisesti tämä riippuu siitä, kuinka hyvin substraattikarbokationi voi vakaantua entsyymin aktiivisessa kohdassa.

Terpeenisyntaasit muodostavat useita tuotteita, mutta tuotteiden monimuotoisuus vaihtelee eri terpeenisyntaaseilla joissakin katalysoiduissa synteesissä, joiden saantona on vähäinen määrä synteesituotteita.¹³ Toiset terpeenisyntaasit puolestaan katalysoivat suuren määrän erilaisia terpeenejä. Terpeenisyntaasit voivat käyttää substraatteina prenyylidifosfaatteja, joiden hiilivetyketjun pituus tai *cis/trans* -rakenne on erilainen.

2.2 Kuusen pihkan koostumus

Kuusen pihka koostuu uuteaineista, patologisesta ja fysiologisesta pihkasta: monoterpeeneistä, seskviterpeeneistä, diterpeeneistä, triterpeeneistä ja terpenoideista.¹¹ Edellä mainittujen lisäksi esiintyy fenolisia yhdisteitä sekä rasvahappoja. Lipofiilisiä uuteaineita ovat rasvahapot, hartsihapot, rasva-alkoholit, sterolit, glyseridit, steryyliesterit, vahat, ketonit ja muut hapettuneet yhdisteet.¹⁴ Taulukosta 2 on esitetty puiden orgaanisten aineiden luokittelu.

Taulukko 2. Puiden orgaanisten uuteaineiden luokittelu¹⁵

Alifaattiset yhdisteet	Fenoliset yhdisteet	Muut yhdisteet
Terpeenit ja terpenoidit sisältäen hartsihapot ja steroidit	Yksinkertaiset fenolit	Sokerit
Rasvahappojen esterit: rasvat ja vahat	Stilbeenit	Sykliset polyolit
Rasvahapot	Lignaanit	Tropolonit
Alkaanit	Isoflavonit	Aminohapot
	Flavonoidit	Alkaloidit
	Proantosyanidiinit	Kumariinit
	Hydrolysoituvat tanniinit	Kinonit

2.2.1 Fysiologinen pihka

Puun varastoima ravinto sijaitsee elävissä tylppy- eli parenkyymisoluuissa.¹¹ Tätä vararavintoa kutsutaan fysiologiseksi pihkaksi. Fysiologinen pihka koostuu rasvoista, vahoista, sekä näiden komponenteista kuten rasvahapoista. Lisäksi parenkyymisoluuissa on steroleita. Parenkyymisolut ottavat vastaan syksyisin ylimääräiset yhteyttämistuotteet, jotka kulkeutuvat latvasta ja oksista takaisin runkoon. Näissä soluissa yhteyttämistuotteet muuttuvat fysiologiseksi pihkaksi eli lähinnä varastorasvaksi.

2.2.2 Patologinen pihka

Sydänpuun, kuoren ja havupuiden pihkatiehyeiden uuteaineita kutsutaan patologiseksi pihkaksi.¹¹ Tämä pihka suojelee puuta mikrobien ja hyönteisten aiheuttamilta vioittumilta. Patologinen pihka sisältää enimmäkseen fenolisia yhdisteitä ja terpenoideja, joita edustavat lähinnä monoterpeenit ja diterpenoidit.

Sydänpuun muodostuessa tylppysolujen toiminta pysähtyy ja tärkkelyksen tuotanto keskeytyy.¹⁰ Yhtäaikaisesti solu ryhtyy voimakkaasti tuottamaan pihkaa, joka valtaa koko puuosan lisäksi myös trakeidisolut. Sydänpuupihka on erilaista verrattuna muuhun runkoon. Sen tarkoituksena on suojella puun ydintä.¹¹

2.2.3 Kalluspihka

Kalluspihka on kallussolukon erittämää pihkaa. Kallussolukon muodostuminen on tyypillistä useimmille havupuulajeille.⁹ Kun puu saa haavan, alkaa samalla suojaava solukko, kallussolukko, muodostaa ensimmäistä suojaavaa kerrosta. Kallussolukko erittää kalluspihkaa haavan suojaksi.¹⁶ Kallussolukko on erilaistumatonta, totipotenttia solukkoa, joka on kantasolujen lähde.

2.3 Terpeenit ja terpenoidit

Havupuiden terpenoidit ovat suurimmaksi osaksi mono-, seskvi- ja diterpenoideja, joiden alkuperä on terpenisyntaasien aktiivisuuden lisäksi myös muista entsyymeistä, kuten esimerkiksi sytokromi P450:stä.¹²

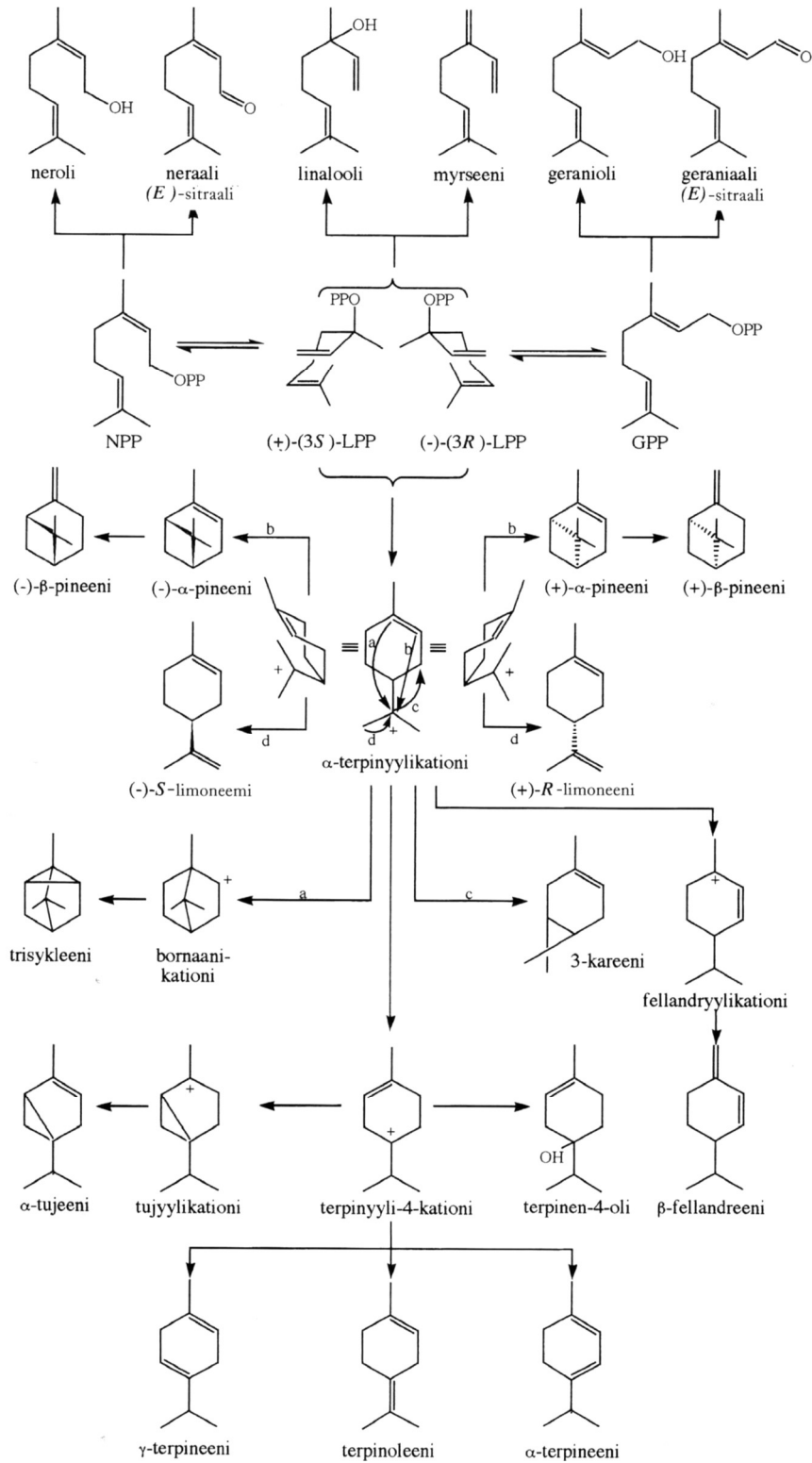
2.3.1 Monoterpeenit ja -terpenoidit

Havupuiden pihkat sisältävät haihtuvia yhdisteitä, ja niiden osuus on 20–50 prosenttia.⁷ Haihtuvat yhdisteet muodostuvat monoterpeeneistä ja seskviterpeeneistä, joista monoterpeenejä on enemmän. Mono- ja seskviterpeenit esiintyvät hiilivety-yhdisteinä, joista osa on hapettuneessa muodossa. Luonnon olosuhteissa monoterpeenit haihtuvat vaihtelevalla nopeudella tuottaen tyypillisen tuoksun havumetsissä lämpimällä säällä.

Monoterpeenejä voi haihtua pihkasta jopa siinä määrin, että niitä voidaan pitää ilmansaasteina.⁷ Maaperässä pihkasta peräisin olevat monoterpeenit voivat vaikuttaa havumetsän typpikiertoon estämällä nitrifikaatiota. Tietyt metsän maaperän mikrobit voivat käyttää monoterpeenejä energianlähteenään, kuten myös eräät merien mikrobit, jotka saavat monoterpeeniannoksensa havumetsien maaperistä meriin virtaavien jokien kautta. Lisäksi mono- ja seskviterpeenit kykenevät estämään hyönteisiä ja patogeeneja valtaamasta havupuuta.

Monoterpeenit syntyvät kolmesta erilaisesta 10 hiiltä sisältävästä prekursorista; geranyylipyrofosfaatista (GPP) ja sen isomeereistä, neryylipyrofosfaatista (NPP) ja linalyylipyrofosfaatista (LPP).⁸ Monoterpeenit ilman rengasrakennetta voivat syntyä joko GPP:sta, NPP:sta tai LPP:sta, jolloin pyrofosfaatti lohkeaa. Yleinen käsitys on, että mono- ja disykliset monoterpeenit ovat syntyneet monoterpeenisyklaasien avulla LPP:sta. LPP muodostuu GPP:sta siten, että aluksi syntyy allyylinen geranyylikationi, jossa resonanssistabiloitumisen myötävaikutuksella difosfaattiryhmä (PP) siirtyy primäärisestä hiilestä (GPP) tertiääriseen hiileen (LPP). Samasta allyylikationista muodostuu NPP kaksoissidoksen stereokemian muutoksella.

Rengasrakenteisten monoterpeenien syntyminen GPP:sta on esitetty kuvassa 5.⁸ GPP laskostuu kahdella tavalla. Toisesta reaktiosta syntyy ionipari, joka stabiloituu (+)-3R-linalyylipyrofosfaatiksi [(+)-3S-LPP]. Toisella tavalla laskostuneesta GPP:sta syntyy (-)-3R-linalyylipyrofosfaatti [(-)-3S-LPP]. Seuraavassa vaiheessa molemmat LPP enantiomeerit ionisoituvat. Näin kehittyneet ketjurakenteiset hiilikationit muodostavat rengasrakenteita, jotka kehittyvät α -terpinyylikationeiksi.



Kuva 5. Syklisten monoterpeenien muodostuminen GPP:sta.⁸

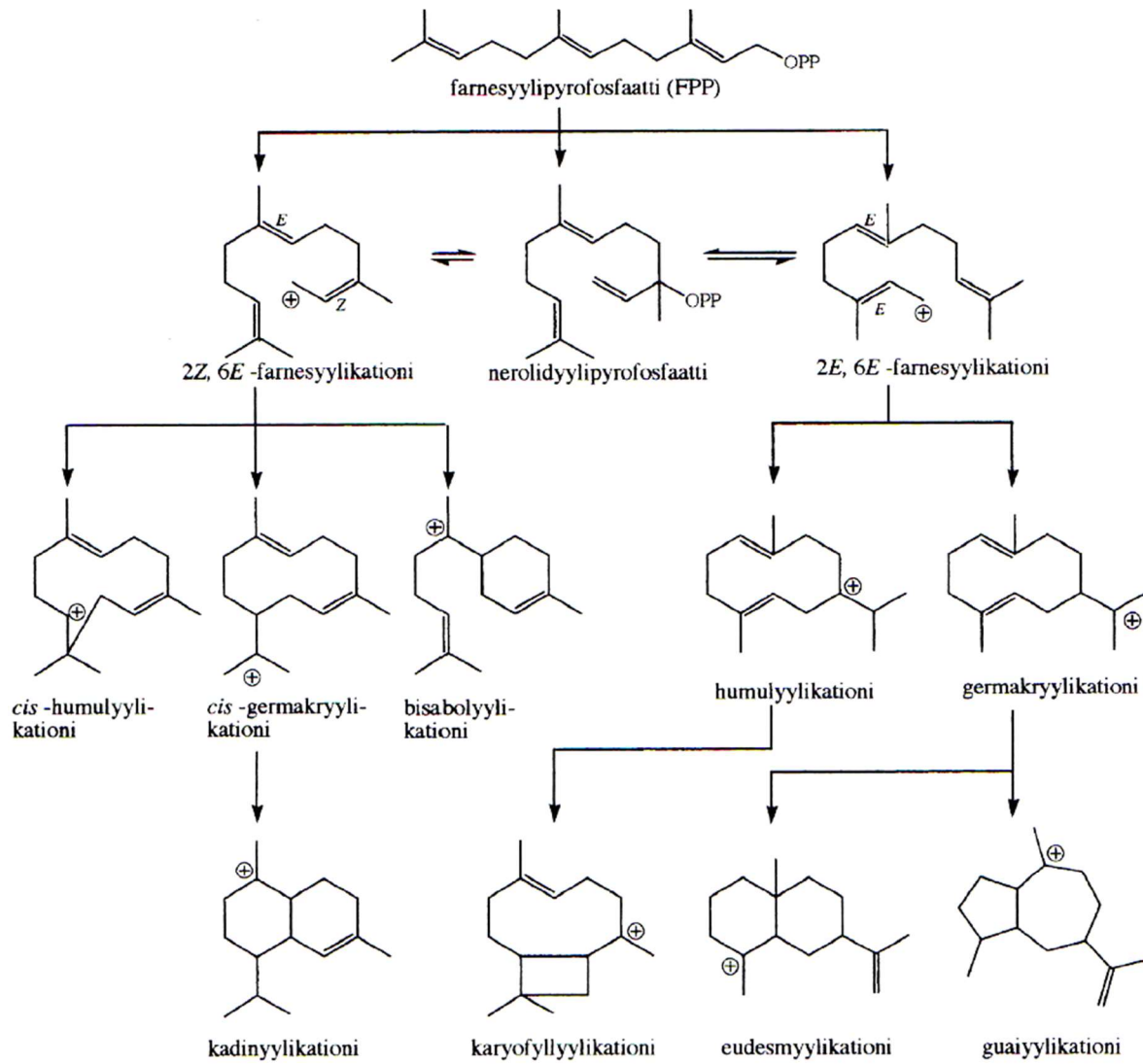
Kuusen pihkassa esiintyviä monoterpeenejä ovat: (-)- α -pineeni, (-)- β -pineeni, (-)-linalooli, myrseeni, (-)-limoneeni ja (+)-3-kareeni, kamfeeni, sabineeni, β -fellandreeni, terpinoleeni, bornyyliasetaatti, 1,8-sineoli ja fenkoni.^{12,17}

Kuusessa runsaimmin esiintyvät monoterpeenit ovat α -pineeni, β -pineeni ja limoneeni.¹⁸ Monoterpeenien auto-oksidaatio mahdollistaa alkuperäisestä yhdisteestä ilman hapen vaikutuksesta useita muita yhdisteitä. Esimerkiksi (4R)-(+)-limoneenista voidaan saada limoneeni-(1,2)-epoksidia, karveolia, 1,8-sineolia ja perillyylialkoholia.

2.3.2 Seskviterpeenit ja -terpenoidit

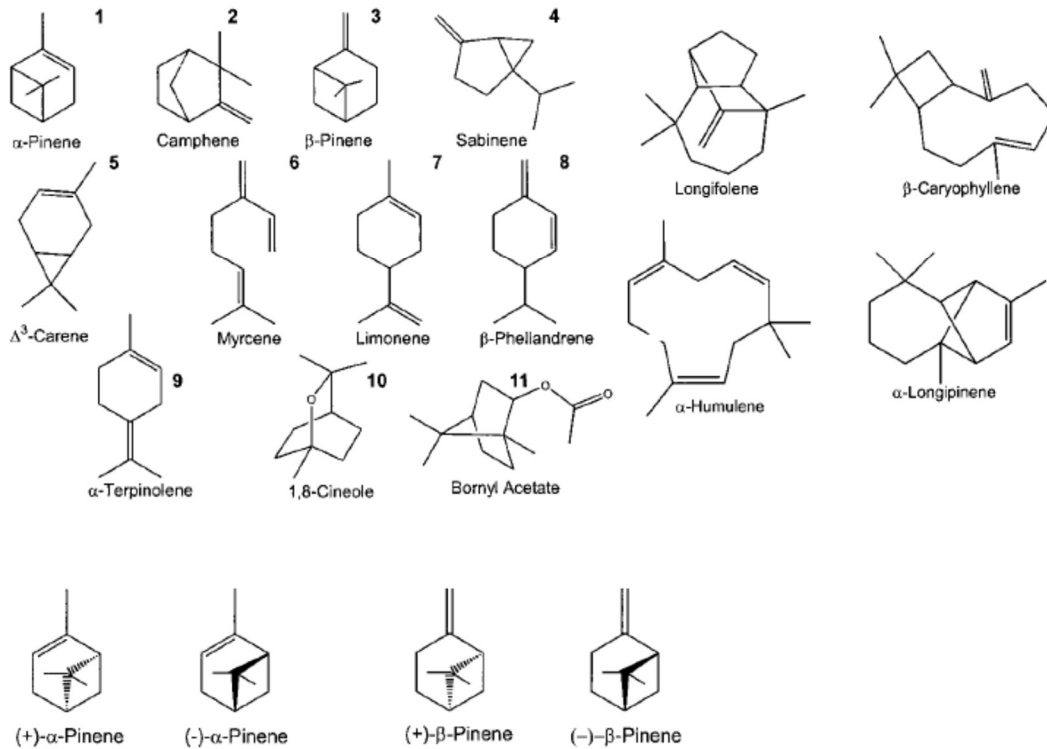
Seskviterpeenit ovat 15 hiilen muodostamia isoprenoideja.⁸ Kuusen pihkan seskviterpeenejä ovat longifoleeni, (E, E)- α -farneseeni, (E)- α -bisaboleeni.¹² Kuten kuvasta 6 voidaan havaita, seskviterpeenit muodostuvat farnesyylipyrofosfaatista (2E,6E-FPP ja 2Z,6E-FPP) tai nerolidiylipyrofosfaatista (NPP). Reaktioissa fosfaattiosa joko hydrolysoituu, syklisoituu tai protoni siirtyy tai poistuu. Ketjurakenteiset farnesaanit syntyvät prekursoreistaan eli FPP:stä tai NPP:stä. Samalla pyrofosfaatti poistuu yhdisteestä.

Seskviterpeenit- ja -terpenoidit ovat monoterpeenien ohella haihtuvia yhdisteitä.⁷ Haihtuvat yhdisteet antavat pihkalle juoksevuutta, mutta myös toimivat pehmentiminä monille viskoottisille pihkoille. Näitä yhdisteitä tavataan etupäässä kuusen kuoressa. Kuvassa 6 esitetään seskviterpeenien muodostuminen FPP:sta.



Kuva 6. Seskviterpeenien muodostuminen FPP:sta.⁸

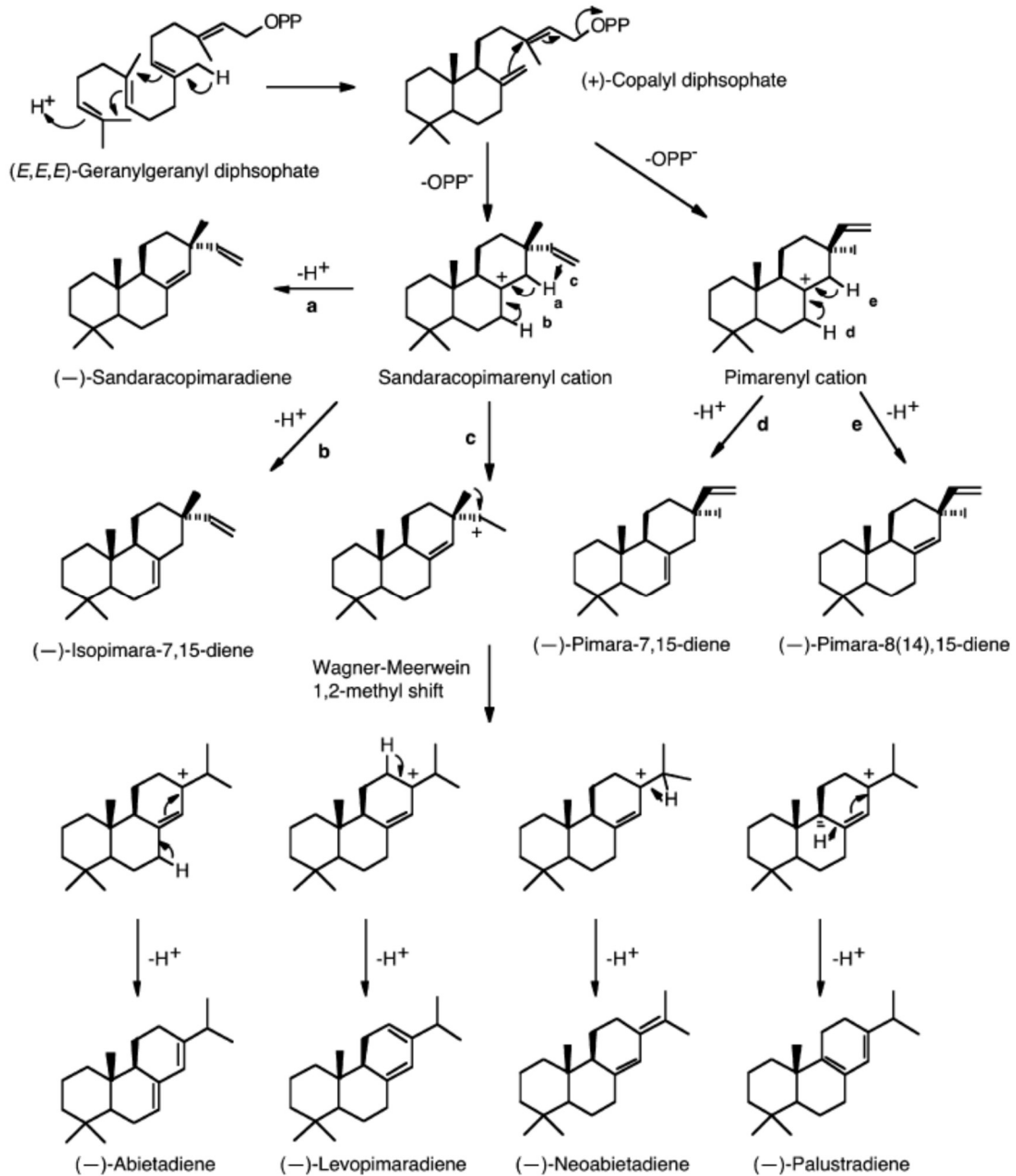
Kuvassa 7 esitetään mono- ja seskviterpeenejä, joita esiintyy kuusen pihkassa.



Kuva 7. Mono- ja seskviterpeenit.¹⁷ Monoterpeenejä ovat: α -pineeni (1), kamfeeni (2), β -pineeni (3), sabineni (4), Δ^3 -kareeni (5), myrseeni (6), limoneeni (7), β -fellandreeni (8), α -terpinoleeni (9), 1,8-sineoli (10) ja bornyyliasetaatti (11). Seskviterpeenejä ovat: longifoleeni, β -karyofyleeni, α -humuleeni ja α -longipineeni. Lisäksi on kuvattu α - ja β -pineenin rakenteet.

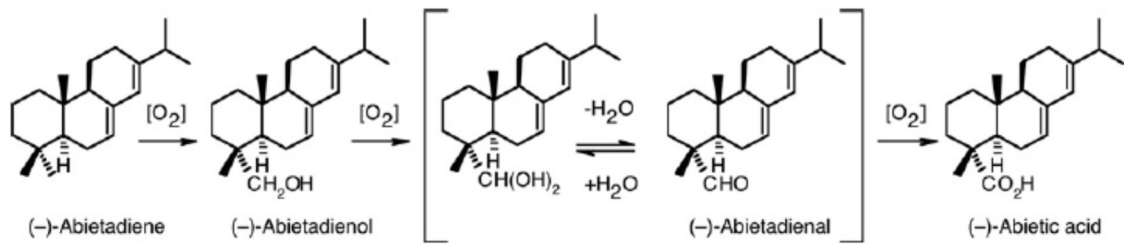
2.3.3 Diterpeenit ja -terpenoidit

Kuusen pihkassa esiintyviä diterpeenejä ovat esimerkiksi abietadieeni, levopimaradieeni, neoabietadieeni ja isopimara-7,15-dieeni.⁷ Esimerkkejä diterpenoideista ovat abietiinihappo, levopimaarihappo, dehydroabietiinihappo, palustriinihappo, neoabietiinihappo. Terpenoidi tarkoittaa yhdistettä, joka käsittää happea sisältävän funktionaalisen ryhmän. Havupuiden haihtumattomat terpenit ovat pääsääntöisesti diterpeenejä ja -terpenoideja. Kuvassa 8 on esitetty oletettu diterpeenireaktiomekanismi.



Kuva 8. Joidenkin diterpeenien geranylgeranyldifosfaattibiosynteesin mahdollinen reaktiomekanismi.¹⁹ OPP merkitsee difosfaattiryhmää.

Kuvassa 9 esitetään otaksuttu reaktiomekanismi abietiinihapon biosynteesille abietadienieistä.



Kuva 9. Mahdollinen reaktiomekanismi abietiinihapon biosynteesille abietadienieistä.¹⁹

Toisin kuin useimmat mono- ja seskviterpeeneistä, diterpeeneitä ei havaita suuria määriä hiilivetyinä havupuiden pihkassa.¹⁹ Sen sijaan diterpeenit muodostavat hydroksylaatio- ja sen jälkeen hapetusreaktiolla vastaavia alkoholeja, aldehydejä, ja happoja. Pihkassa voidaan havaita lähinnä happoja. Sytokromi P450 mono-oksigenaasit (CYP450) osallistuvat näihin reaktioihin. Nämä hemiä sisältävät proteiinit ovat suuri ryhmä entsyymejä, jotka käyttävät NADPH:ia, nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin pelkistynyttä muotoa, tai NADH:ia, nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin pelkistynyttä muotoa, poistamaan happea pelkistämällä ja samalla tekemään substraatin toimivaksi hapettamalla. CYP450 ei kuitenkaan toimi kaikkien havuissa olevien diterpenoidiprekursoreiden kanssa.

Diterpeenit ja niiden yhdisteet voivat muodostaa niin ketjurakenteisia kuin mono-, di- ja trisyklisiä yhdisteitä.¹⁰ Monet näistä yhdisteistä sisältävät kaksoissidoksia, mikä voi johtaa yhdisteiden hapettumiseen ja polymeroitumiseen. Jälkimmäinen reaktio puolestaan aiheuttaa suurimolekyylisiä yhdisteitä, jotka eivät liukene helposti.

2.3.4 Triterpeenit, triterpenoidit ja sterolit

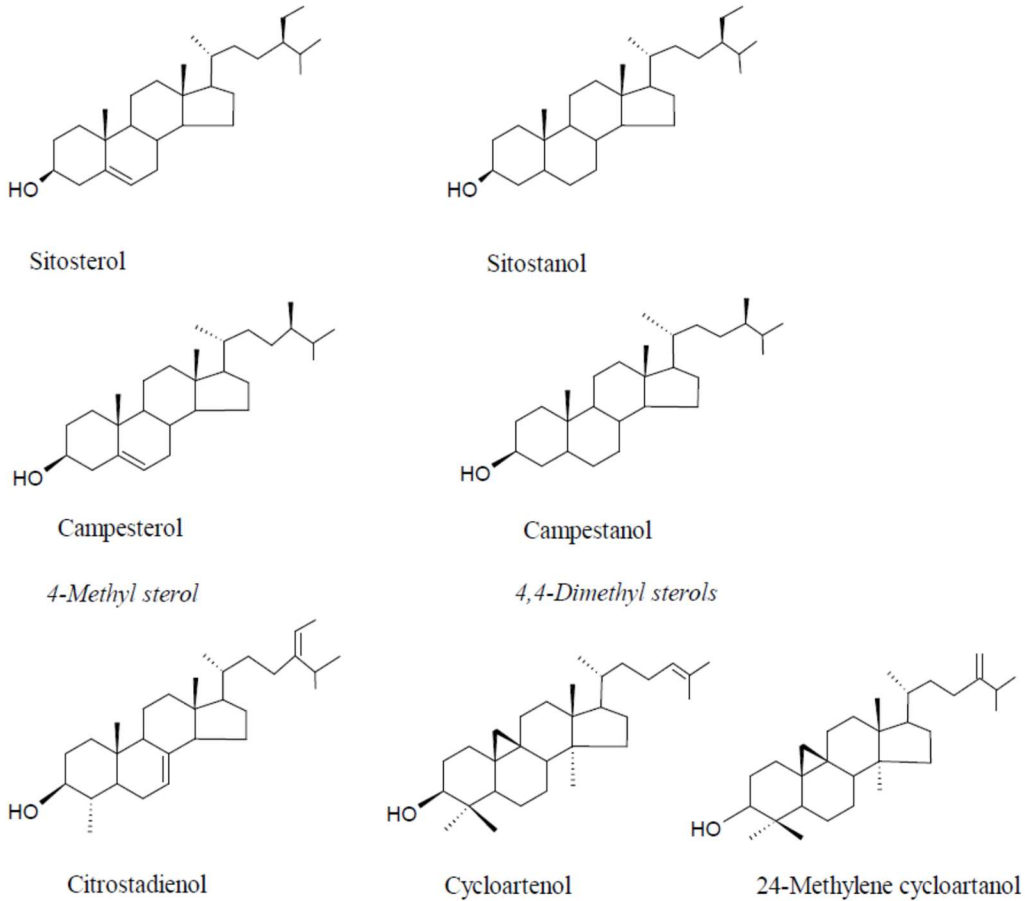
Triterpeenit ovat 30 hiiltä sisältäviä isoprenejä, jotka syntyvät kahden farnesyylipyrofosfaattiyksikön dimeroituessa skvaleenisyntaasin avulla.⁸ Farnesyylipyrofosfaattien häntien kytkeydyttyä toisiinsa syntyy skvaleeni.

Euroopankuudessa ja siperiankuudessa esiintyvät serrataani -tyyppiset yhdisteet muodostavat viisirenkaisia triterpeenejä.^{20,21} Erityisenä piirteenä on epätavallinen seitsemän hiilen rengas. Ne syntetisoituvat 2,3,22,23-diepoksiskvaleenista syklistoitumalla, ei 2,3-epoksiskvaleenista, kuten useimmat viisirenkaiset triterpeenit.

Päinvastoin kuin serratenoideja, metoksi-serrateeneja esiintyy vain havupuissa, erityisesti männyissä ja kuusissa.²² 2,3,22,23-diepoksiskvaleenista muodostuu onoseraanin kautta serrataania.²¹

Euroopankuusen kuori sisältää 3 α -metoksyserrat-14-en-21 β -olia, 3 β -metoksyserrat-14-en-21 β -olia ja 21 α -metoksyserrat-14-en-3-onia.²² Siperiankuusesta on puolestaan uutettu 3 α -metoksyserrat-14-en-21 β -olin ja 3 β -metoksyserrat-14-en-21 β -olin lisäksi 3 β -metoksyserrat-13-en-21-onia, 3 α -metoksyserrat-14-en-21-onia ja 3 β -metoksyserrat-14-en-21-onia.

Kuusen sisältämiä steroleita ovat β -sitosteroli, kampesteroli, kampestanoli, sitostanoli, sitrostadienoli, sykloartenoli ja 24-metyleenisykloartanoli, kuten kuvasta 10 voidaan havaita.²³ β -sitosterolia esiintyy huomattavasti eniten kuudessa. Sterolit esiintyvät lähinnä estereinä.



Kuva 10. Kuusen sterolit.²³

2.4 Rasvat ja vahat

Rasvat ja vahat ovat vallitsevia yhdisteitä parenkyymisolujen lipofiilisessä aineksessa.¹¹ Parenkyymisolujen fysiologinen pihka muodostuu lähinnä rasvoista, jotka sisältävät etenkin tyydyttämättömiä öljy-, linoli- ja linoleenihappoja. Kuusessa on myös kemiallisesti sitoutumattomina, vapaina alkoholeina tyydyttyneitä dokosaani- ja tetrakosaanialkoholeja.

Vapaat rasvahapot esiintyvät etupäässä estereinä, joten vapaana niitä on niukasti.¹⁰ Glycerolin rasvahappoesterit eli rasvat ovat enimmäkseen triglyseridimuodossa. Tyydyttyneet rasvahapot eivät juuri reagoi, mutta tyydyttämättömät rasvahapot hapettuvat herkästi ja ottavat osaa additioreaktioihin.

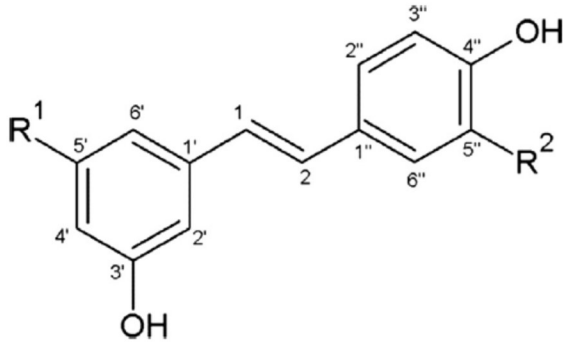
2.5 Fenolit ja polyfenolit

Puun uuteaineet käsittävät runsaslukuisesti fenolisia yhdisteitä, joista lignaanit, stilbeenit, kondensoituneet tanniinit, hydrolysoituneet tanniinit ja flavonoidit ovat suurimpia ryhmiä.¹¹ Fenoliset yhdisteet ovat rengasrakenteisia sisältäen yhden tai useamman bentseenirenkaan ja ovat sillä tavoin kromoforisia yhdisteitä. Puun väri perustuu lähinnä fenolisiin yhdisteisiin. Fenolisia yhdisteitä esiintyy huomattavasti sydänpuussa ja kuoressa. Fungisideina ne tuhoavat mikrobeja suojaten siten puuta. Fenoliset yhdisteet liukenevat polaarisiin liuottimiin kuten esimerkiksi veteen.²⁴

Lignaaneja esiintyy eritoten oksa- ja sydänpuussa.¹¹ Pintapuussa niiden konsentraatio on sangen vähäinen. Lignaanien rakenne muodostuu kahdesta fenyylipropaaniyksiköstä (C₆C₃). Männyt, kuuset, ja lehtikuuset sisältävät muun muassa pinoresinolia, larisiresinolia, matairesinolia, liovilia sekä konidendriinia.

Kuusesta tunnistettu on seuraavia lignaaneja: hydroksimatairesinolin kaksi isomeeria, sekoiolarisiresinoli, α -konidendriini, α -konidendriinihappo, isohydroksimatairesinoli, larisiresinoli, lignaani A, matairesinoli, nortrakelogeniini, todolaktoli A ja isolioviili.²⁵ Pohjois-Suomessa kasvavien kuusien oksissa lignaanipitoisuus on huomattavasti suurempi kuin eteläsuomalaisissa kuusissa.

Kuusen kuoresta on löydetty hydroksyloituja stilbeeniglukosideja, transstringiinia ja transisorapontiinia, jotka ovat sen yleisimpiä yhdisteitä, sekä 3- β -mono-D-glukosidi-resveratrolia, kuten kuvasta 11 voidaan havaita.²⁶ Stilbeeniglukosidien aglykoneja kuten myös useita stilbeeniglukosidin dimeerejä on tunnistettu. Koska stilbeeneillä on antioksidatiivisia ja suojaavia vaikutuksia, nämä yhdisteet ovat herättäneet kaupallista mielenkiintoa.



Kuva 11. Stilbeenyhdisteiden kemialliset rakenteet kuusen kuoressa ja nilassa.²⁶

$R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$, *trans*-resveratrol, $R^1 = R^2 = \text{OH}$, *trans*-pikeatannoli, $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{OCH}_3$, *trans*-isorapontingeniini, $R^1 = \text{OGlc}$, $R^2 = \text{H}$, *trans*-resveratrol – 3 – β – mono -D-glukosidi, $R^1 = \text{OGlc}$, $R^2 = \text{OH}$, *trans*-astringiini, $R^1 = \text{OGlc}$, $R^2 = \text{OCH}_3$, *trans*-isorapontiini. OGlc = -O- β -D glukosidi.

Tanniinit ovat polyfenolisia yhdisteitä, joiden perustana on joko flavan-3-olimonomeerit, gallushappo tai heksahydrodifeenihapon esterit, jotka ovat yhdistyneet sokeriosaan (hydrolysoituvat tanniinit).²⁷ Tanniinien molekyylipaino on 500 – 3000 Da. Kuusen tyypillisiä tanniineja ovat lähinnä kondensoituneet tanniinit.

Hydrolysoituvat tanniinit eli proantosyanidit muodostuvat parkkihapon ja sen dimeerien kuten ellagihapon sekä monosakkaridien muodostamista estereistä.¹¹ Nämä uuteaineet hydrolysoituvat vaivatta, jolloin lohkeaa gallus- ja ellagihappoja, monosakkarideja ja glukoosia. Useiden flavonoidiyksikköjen muodostamat kondensoituneet tanniinit ovat flavonoidien derivaattoja.

Flavonoidien konstruktio on trisyklinen ja muodoltaan $C_6C_3C_6$.¹¹ Flavonoidit ovat muodostuneet kahdesta aromaattisesta yksiköstä, ($2 \times C_6$), joiden yhdistävä osa on C-3-yksikkö, joka tavallisesti on syklistoitunut γ -pyroniksi.⁸ Flavonoideja esiintyy kuusen kuoren, oksien ja neulasten lisäksi sydänpuussa.²⁴

Flavonoidit ovat yleensä glykosidimuodossa liukoisia eli yksi tai useampia flavonoidien hydroksyyliiryhmistä on reagoanut sokerin kanssa muodostaen glykosidin.⁸ Myös hiiliatomiin sitoutuneiden glykosidien muodostuminen on mahdollista. Kuusen flavonoideissa esiintyvät yleisimpiä monosakkarideja ovat muun muassa glukoosi ja rutinoosi. Myös asetyyliglukosidit, diglykosidit ja p-kumaryyliglukosidit ovat mahdollisia.²⁸ Kuvassa 12 esitetään kuusen flavonoidien aglykonien rakenteet ja taulukossa 3 flavonoidit sokeriosineen.

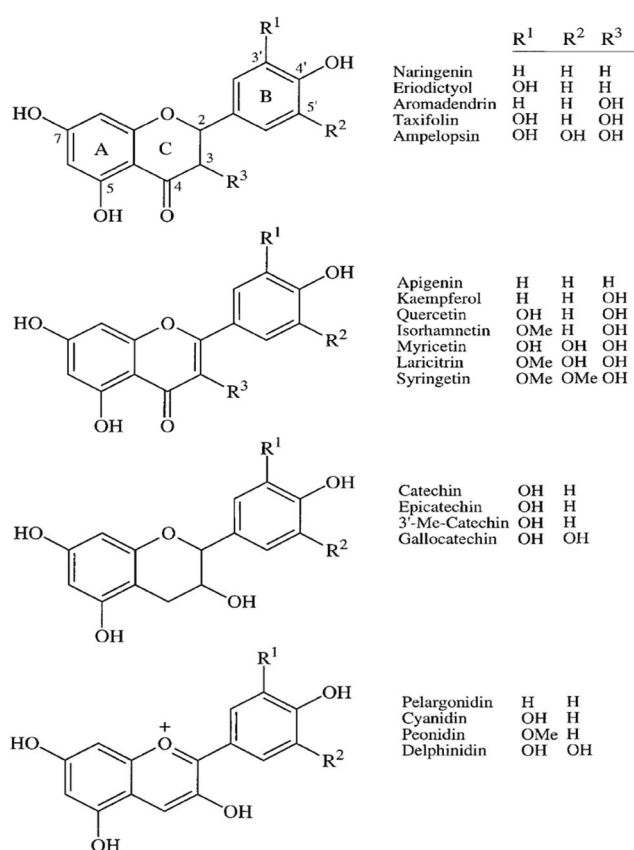


Figure 2. Aglycones of the different flavonoids found in *Picea abies*.

Kuva 12. Euroopankuusesta löydettyjen erilaisien flavonoidien aglykoneja.²⁸

Taulukko 3. Kuusesta löytyneet flavonoidit aglykoneineen²⁸

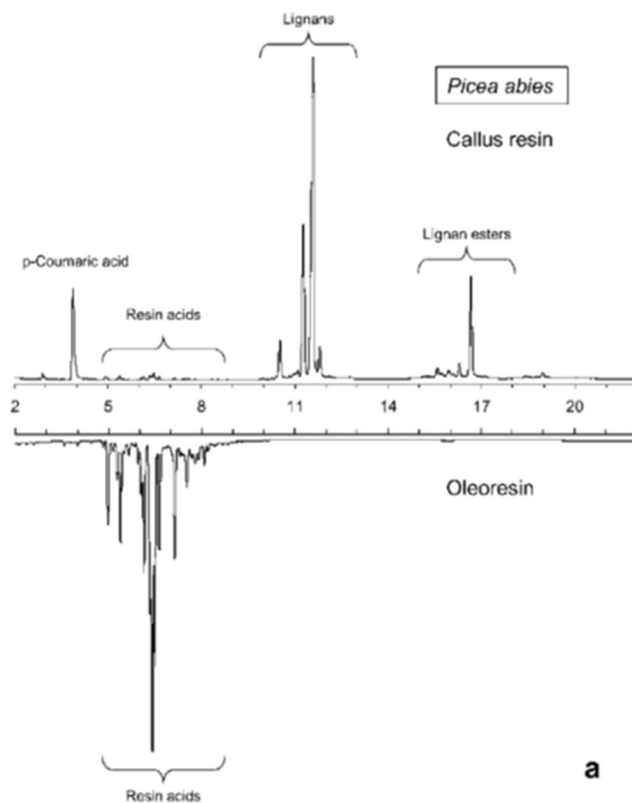
x = löydetty ennen 1992; □ = löydetty 1992 jälkeen; ■ = artikkelissa uusi; glc = glukosidi; rut = rutosidi; coum = p-kumaryyli.

	aglycone	7-glc	3'-glc	1-glc	3-(ac)glc	3-rut	3,4-di-glc	3-(coum)glc
<i>Dihydroflavones</i>								
Naringenin		x						
Eriodictyol		□						
<i>Dihydroflavonols</i>								
Aromadendrin		□						
Taxifolin	x	□	□					
Ampelopsin		■						
<i>Flavones</i>								
Apigenin		□						
<i>Flavonols</i>								
Kaempferol	x	x		x	□	x	x	□
Quercetin	x	□	x	x	□	□		
Isorhamnetin	x			x	□*	□		
Myricetin		□		□	■	□	■	
Laricitrin				□	■	□		
Syringetin		■		□	■	□		
<i>Flavan-4-ols</i>								
Catechin	x							
3'-O-Me-Catechin		■*						
Epicatechin	x							
Gallocatechin	x							
<i>Anthocyanins</i>								
Pelargonidin				□				
Cyanidin				x				
Peonidin				□				
Delphinidin				x				

*Reported by Pan & Lundgren, 1995.

3 Kuusen pihkan etanoliuutteen koostumus

Alla olevassa kuvassa 13 on esimerkki kuusen kalluspihkan ja patologisen pihkan etanoliuutteen GC-kromatogrammeista.⁹ Päällimmäinen kromatogrammi kuvaa kalluspihkan yhdisteitä. Alempi piikit alassuin kuvattu piikkipatteri on patologisen pihkan kromatogrammi. Kuusinäytteet on kerätty vuosina 2003-2007 Etelä-Suomesta.



Kuva 13. Kuusen kalluspihkan ja patologisen pihkan koostumus.⁹

Kuvasta 13 voidaan havaita, että kalluspihka ja patologinen pihka poikkeavat lähes täysin koostumuksensa puolesta toisistaan. Kalluspihka koostuu 4-hydroksikanelihaposta, lignaaneista ja lignaanien estereistä. Patologinen pihka puolestaan koostuu pelkästään hartsihapoista. Taulukossa 4 on tarkemmin eritelty kummankin pihkan koostumukset.

Taulukko 4. Kuusen kalluspihkan ja patologisen pihkan koostumus⁹

(% w w ⁻¹) ^a	Callus resins ^b				Oleoresins ^b	
	1	2	3	4	1	2
Pinoresinol	11.8	18.6	11.9	10.4	–	–
Lariciresinol	3.2	8.6	7.3	6.1	–	–
Secoisolariciresinol	1.4	1.8	2.4	2.5	–	–
Lariciresinol coumarate	4.1	5.9	6.7	5.0	–	–
Unidentified lignan esters	3.9	3.0	3.9	3.0	–	–
<i>p</i> -Coumaric acid	14.7	7.7	12.7	13.1	–	–
Ferulic acid	0.7	0.3	0.6	0.5	–	–
Caffeic acid	1.0	0.4	1.1	1.1	–	–
Pimaric acid	–	–	–	0.2	1.4	1.2
Sandaracopimaric acid	–	–	–	0.2	2.9	2.9
Isopimaric acid	0.2	0.2	0.2	0.7	5.8	3.4
Palustric acid	0.2	0.1	0.3	0.7	10.1	11.7
Levopimaric and dehydroabietic acid	0.3	–	0.4	1.6	35.2	29.2
Abietic acid	0.2	0.1	0.2	0.6	4.1	3.7
Neoabietic acid	–	–	0.2	0.3	4.0	2.2
Unidentified	8.0	6.6	10.1	11.9	11.5	14.3
Sum of all peaks	49.8	53.2	57.8	58.0	75.0	68.7

^aNot detected or concentration <0.1% w w⁻¹.

^bSeparate samples.

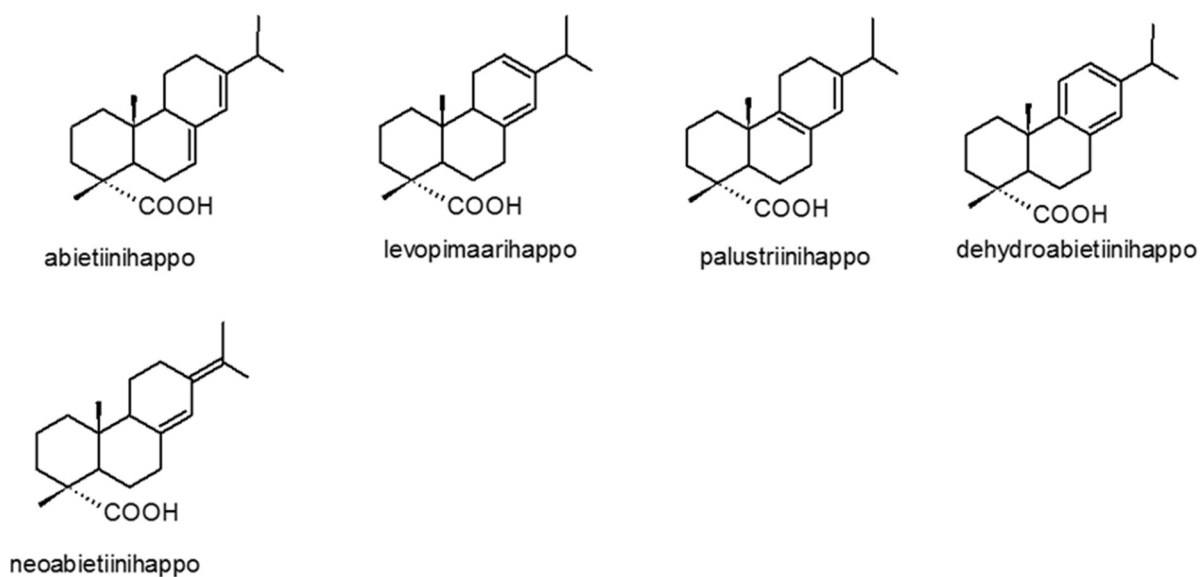
3.1 Hartsihapot

Hartsihapot ovat diterpenoideja, eli koostuvat neljästä isopreenistä ja yhdestä tai useammasta heteroatomista.⁸ Hartsihapoille tyypillistä on kolmirenkainen rakenne. Hartsihapot voidaan jakaa rakenteen mukaan myös abietaaneihin ja pimaraaneihin. Taulukosta 5 voidaan havaita hartsihappojen ominaisuuksia. Kuvasta 14 voidaan havaita abietaaneihin ja kuvasta 15 pimaraaneihin kuuluvat hartsihapot. Tyypillisiä piirteitä abietaaneille on konjugoitu kaksoissidos renkaissa, isopropyyliryhmä, kaksi metyyliiryhmää ja karboksyyliiryhmä. Pimaraaneille tyypillisiä ryhmiä on kolme metyyliiryhmää, karboksyyliiryhmä ja vinyyliryhmä. Kaksoissidoksia esiintyy myös pimaraanien renkaissa. Hartsihapot ovat lipofiilisiä yhdisteitä.

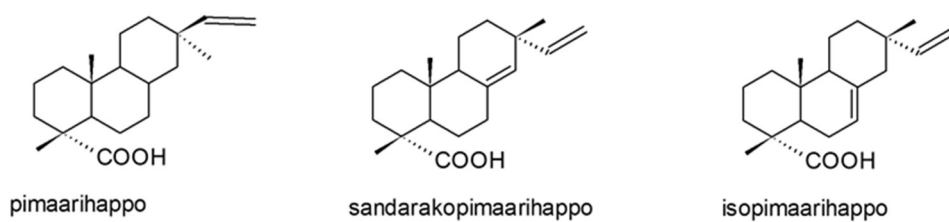
Taulukko 5. Hartsihappojen ominaisuuksia^{40,42}

Hartsihappo	Molekyylipaino (g/mol)	Sulamispiste (°C)	Tiheys (g/cm ³)	Ulkomuoto	Liukoisuus
Abietiinihappo	302,45	173,5	1,06±0,1	monokliiniset levyt	erittäin liukoinen asetoniin, bentseeniin, dietyylieetteriin ja etanoliin
Levopimaarihappo	302,45	150	1,06±0,1	ortorombiset kiteet	
Palustriinihappo	302,45	164,5	1,06±0,1	kiteet	
Dehydroabietiinihappo	300,44	166-167	1,058±0,06	kiteet	
Neoabietiinihappo	302,45	165-167	1,06±0,1	kiteet	
Pimaarihappo	302,45	218,5	1,05±0,1	ortorombiset kiteet	erittäin liukoinen dietyylieetteriin, pyridiiniin, etanoliin
Isopimaarihappo	302,45	160	1,05±0,1		
Sandarakopimaarihappo	302,45	248	1,05±0,1	ortorombiset kiteet	

Sulamispiste ja tiheys ovat peräisin viitteestä 40.



Kuva 14. Kuusen pihkassa esiintyvät abietiinihapon tyyppiset hartsihapot.



Kuva 15. Kuusen pihkassa esiintyvät pimaarihapon tyyppiset hartsihapot.

Hartsihapot isomeroituvat vahvojen happojen avulla tai lämmön vaikutuksesta.²⁹ Hartsihapot absorboivat happea ilmasta erityisesti jauhemaisessa olomuodossa. Levopimaari-, palustriini-, neoabietiini- ja abietiinihappo isomeroituvat kloroformissa ja saavuttavat tasapainotilan tyypiatmosfäärissä ja pimeässä, jolloin yhdisteiden pitoisuuksiksi muodostuu 92 prosenttia abietiinihappoa, 5 prosenttia palustriinihappoa ja 3 prosenttia neoabietiinihappoa. Kun kyseisiä hartsihappoja liuotetaan α -pineeniin pimeässä, kaikki yhdisteet mukaan lukien liuotin hapettuvat. Kun liuottimena on oktanoli, vastaavaa hapettumista ei tapahdu myöskään ilman hapessa. Homoannulaariset dieenit, kuten palustriini- ja levopimaarihappo, hapettuvat dehydroabietiinihapoksi. Heteroannulaariset dieenit, esimerkiksi abietiini- ja neoabietiinihappo, hapettuivat ainoastaan happiaddukteiksi.

Hartsihapposeoksen koostumuksen määrittämistä vaikeuttaa hartsihappojen rakenteen samankaltaisuus ja toisaalta abietaanityyppiset hartsihapot isomeroituvat helposti lämmön tai happojen vaikutuksesta.³⁰ Abietaanityyppisillä hartsihapoilla on kaksi kaksoissidosta konjugoituneena, kun taas pimaarityyppisten hartsihappojen kaksoissidokset eivät ole konjugoituneet. Abietaanityyppisten hartsihappojen rakenne määrittää kyseisten yhdisteiden reaktioita, kuten isomerisaatiota, hapettumista ja additioreaktioita. Abietiini-, neoabietiini-, levopimaari- ja palustriinihappo ovat tasapainossa toistensa kanssa mineraalihappoon liuenneena tai lämpötilan noustua yli 100 celsiusasteen.

Kun levopimaarihappo on lämpimässä tilassa tai laimeaan happoon liuenneena, levopimaarihappo isomeroituu kolmeksi muuksi hartsihapoksi, kunnes vain vähän levopimaarihappoa on jäljellä.³⁰ Palustriini- ja abietiinihappoa näyttää muodostuvan aluksi lähes yhtä suuret määrät ja neoabietiinihappoa pienempi osuus. Jos kuumennus tai happokäsittely jatkuu, tasapainoseos sisältää lähinnä abietiinihappoa. Tämä isomerisaatioreaktio vaikuttaa siten, että puun rosiinin valmistusprosessiin liittyvän kuumennuksen vuoksi levopimaarihappoa ei juuri esiinny.

Vain levopimaarihappo reagoi maleiininhydridin kanssa Diels-Alder-reaktiomekanismin avulla.³⁰ Levopimaarihappo reagoi huoneen lämpötilassa, kun taas muut abietaanityyppiset hapot eivät reagoi ollenkaan. Epäorgaanisessa happoliuoksessa tai lämmön nousun vaikutuksesta tasapaino löytyy näille neljälle hartsihapolle. Kun levopimaarihappo on reagoinut, tasapaino siirtyy tuottamaan lisää levopimaarihappoa, ja lopulta koko seos on muuttunut levopimaarihappo-maleiininhydridiadduktiksi hyvällä saannolla.

Happokäsittely tai kuumennus 270 celsiusasteeseen aiheuttaa abietaanityyppisten hartsihappojen disproportioitumista.³⁰ Samanaikaisesti tapahtuu hydraus ja dehydraus, jolloin muodostuu dehydroabietiini-, dihydroabietiini- ja tetrahydroabietiinihappoa. Katalyytteinä voi reaktiossa käyttää jodia, rikkiä ja seleeniä. Kuumennus 300 celsiusasteeseen katalyytin kera dehydraa seoksen täydellisesti reteeniksi.

Abietaanityyppisten hartsihappojen konjugoitunut kaksoissidossysteemi tekee ne erittäin alttiiksi hapettumiselle.³⁰ Puuhakkeen muutaman tunnin altistus riittää aiheuttamaan huomattavan pudotuksen pihkan levopimaarihapon pitoisuudessa. Monessa tutkimuksessa on osoitettu, että hapetettaessa abietaanityyppistä hartsihappoa konjugoitu kaksoissidos poistuu ja samalla muodostuu peroksiedeja ja hydroksyyliyhmiä. Spektrofotometrinen tutkimus osoitti hydroksiabietiini- ja hydroksineoabietiinihappojen muodostumisen.

Puhdas levopimaarihappo ei hapetu, kun se on alttiina ilmalle usean päivän ajan.³⁰ Mäntypuu-uutteen lisääminen kuitenkin mahdollistaa nopean ja täydellisen isomeroitumisen ja hapettumisen. Useat väriaineet ja ortobentsokinonit toimivat myös valoherkistiminä. Tämän reaktion ensisijainen tuote oli transannulaarinen peroksidi, joka järjestyi uudelleen alkaliseen liuokseen muodostaen tyydyttämättömän hydroksiketonin. Joissakin olosuhteissa muodostui myös hieman dehydroabietiinihappoa. Kuumennettaessa jotkin hapettuneet hapot dehydraantuivat, jolloin saannoksi saatiin dehydroabietiinihappoa. Tämä on luultavasti yksi syy korkeaan dehydroabietiinihapon esiintymiseen.

Levopimaarihappoa voidaan hapettaa alkalisella permanganaatilla, ja reaktiotuotteena on dihydroksiepoksilevopimaarihappo.³⁰ Vedettömässä väliaineessa kuitenkin hapetus permanganaatilla muuttaa levopimaarimetyyliesterin dehydroabietiinihapon metyyliesteriksi. Osmiumtetroksidi pyridiinissä antaa tulokseksi dihydroksi- ja tetrahydroksilevopimaarihappoja.

Halogeenien lisääminen abietaanihappojen kaksoissidoksiin eivät muodosta dihalo- tai tetrahalojohdoksia.³⁰ Jonkin verran substituutio- ja dehydrohalogenaatiota tapahtuu, minkä tuloksena on polyhaloyhdisteitä, jotka ovat ekvivalentteja kolmen kaksoissidoksen kanssa. Halogeenijohdokset ovat suhteellisen epästabiileja.

Hartsihappojen kaksoissidoksien reaktioiden lisäksi karboksyyliiryhmän reaktiot ovat myös tyypillisiä, kuten esimerkiksi suolan muodostus.³⁰ Kaupallisen rosiinin natriumsuolaa on käytetty laajalti paperin pintakäsittelyssä, jossa hartsihappojen saostuminen tapahtuu alunan avulla.

Abietiini-, neoabietiini- ja sandarakopimaarihappojen natriumsuolat ovat helposti veteen liukenevia, kun taas pimaari- ja levopimaarihapon suolat ovat veteen hyvin niukkaliukoisia.³⁰ Hartsihappojen amiinisuoloja on käytetty eristämään tiettyjä hartsihappoja puhtaassa muodossa. Pihkan hartsihappojen kokonaismäärä on mahdollista saostaa kiteisenä sykloheksyyliamiinisuolana, joka voidaan regeneroida käyttäen boorihappoa. Tietyissä olosuhteissa 4-amino-1-butanoli on sopiva levopimaarihapon saostamiseen, ja puhdasta neoabietiinihappoa on eristetty jakokiteyttämällä dietyyliamiini- ja 4-amino-1-butanolisuoloista. Hartsihapot ovat optisesti aktiivisia, ja hartsihapon tai sen amiinisuolan optista kiertoa on usein käytetty määrittämään yhdisteen puhtautta.

Hartsihappojen seosta eli levopimaari-, neoabietiini-, palustriini-, abietiini-, ja isopimaarihappojen triglyseridiseosta yhdessä on käytetty kroonisten sairauksien kuten reumatismin ja kihdin hoitamisessa.³² Abietaaneja käytetään omina yhdisteinään antimikrobiologisiin tarkoituksiin, vatsahaavalääkkeisiin, allergialääkkeisiin ja kosmeettisiin sekä dermatologisiin valmisteisiin. Abietiini-, dehydroabietiini- ja neoabietiinihappo ovat hartsihapposeoksen antibakteeriseen aktiivisuuteen myötävaikuttavat pääkomponentit.

Vertailevia tutkimuksia on tehty 12-hydroksi-8,11,13-abietatrieeni-20-karboksyylihapolla, dehydroabietiinihapolla, podokarpiinihapolla ja ferruginolilla.³² Tulokset ovat osoittaneet, että aromaattinen rengas ja isopropyyliryhmä vaikuttavat antimikrobisesti gram-positiiviseen bakteeriin.

Abietiinihapot muodostavat filmejä.³² Abietiini- ja neoabietiinihappoja liuoksessa, aerosolissa tai muussa farmaseuttisessa muodossa käytetään vakavissa palovammoissa tai haavoissa suojaamaan ihoa infektioilta. Abietiini- ja dehydroabietiinihapoilla on myös vaikutus seerumin kolesterolipitoisuuksiin. Lisäksi on havaittu abietiinihapon verisuonitukoksia ehkäisevä vaikutus.

Pihkojen happokomponenttien allergeenisista ja antiallergeenisista ominaisuuksista on kiistelty pitkään.³² Abietiinihappoa on pidetty klassisena allergeeninä, mutta se ei tutkimusten mukaan aiheuta allergiaa ja sitä käytetään antiallergisien yhdisteiden valmistukseen. Kuitenkin auto-oksidaation avulla syntynyt hapetustuote, 15-hydroperoksiabietiinihappo, kuten myös muut abietiinihydroksihapot, on tunnistettu kolofonien allergisten reaktioiden lähteiksi. Ihotesteissä on osoitettu, että dehydroabietiini- ja Δ^8 -dihydroabietiinihapot, niiden suolat ja esterit ovat IgE:n aiheuttamien ihoallergioiden estäjiä.

Abietiini- ja dehydroabietiinihapon, niiden suolojen ja amidien pinta-aktiiviset ominaisuudet glysiinin ja muiden aminohappojen kanssa tekevät niistä sopivia veden pehmentämiseen ja siksi niitä on käytetty iho- ja hiushoitoihin.³² Abietiinihapon on myös raportoitu olevan aktiivinen ainesosa hilsesampoissa, kynsilakoissa ja hiusten kiiltoaineissa.

Abietiinihappo on toksinen keuhkoepiteelille.³² Sen myrkyllisyys riippuu ajasta ja annostuksesta ja se aiheuttaa keuhkorakkulan epiteelin tuhoutumisen aiheuttaen astmaa ja kroonisia keuhkosairauksia.

Kuten pimaarihappoakin, abietiinihappoa esiintyy kuusen pihkassa merkittävässä määrin.³³ Abietiinihappoa syntyy vastaavanlaisesta 3-renkaisesta rakenteesta, kun kaksoissidokset isomeroituvat. Kun abietiinihappoa lämmitetään ja katalysoidaan, se disproportoituu esimerkiksi dehydro-, dihydro- ja tetrahydroabietiinihapposeokseksi. Abietiinihappo on kiteistä ainetta. Puhdas abietiinihappo ei liukene veteen, mutta se liukenee hyvin eetteriin ja bentseeniin. Etanoliin ja asetoniin se liukenee edellä mainittuja niukemmin. Abietiinihappo sietää huonosti ilmaa, valoa tai lämpöä ja alkaa hajaantua.

Abietiini- ja dehydroabietiinihappo kykenevät tuhoamaan eritoten gram-positiivisia bakteereita ja sieniä.³⁴ Edellä mainituista yhdisteistä on tehty lukuisia määriä johdoksia, jotka todennetusti ovat tehostaneet antimikrobisia aktiivisuuksia esimerkiksi *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. ja *Cladosporium* sp. mikrobisukuja vastaan. Lisäksi niiden semisynteettiset johdokset ovat osoittaneet reaktioita malariaa ja muita alkueläinsairauksia vastaan. Abietiinihappo ei itsessään ole myrkyllinen ihmisluille. Useilla abietiini- ja dehydroabietiinihapon johdoksilla on kohtalaisia joidenkin syöpäsolujen lisääntymistä estäviä ominaisuuksia.

Levopimaarihappo muuttuu abietiinihapoksi, kun levopimaarihappoa lämmitetään tai kun yhdisteeseen lisätään happoa.³³ Ilma ja valo eivät hajota tätä yhdistettä yhtä paljoa kuin abietiinihappoa, joten sen säilytys ei vaadi erityisiä toimenpiteitä. Levopimaarihappoa voidaan kiteyttää amiinisuoloinaan lähes puhtaasta hartsihappofraktiosta. Sillä on hyönteisiä ja haitallisia mikrobeja tuhoava vaikutus.³⁵ Erityisesti sen johdoksilla on antibakteerisia, kardiovaskulaarisia ja antioksidanttisia vaikutuksia.

Levopimaarihappo liukenee paremmin kuin pimaarihappo.³⁶ Se auto-oksidoituu ja uudelleen järjestyy abietiinihapoksi lämmön, mineraalihappojen tai kuuman etikkahapon vaikutuksesta. Edellä mainitut seikat vaikeuttavat levopimaarihapon eristämistä. Lisäksi lämpötila ei saisi ylittää 60 °C. Suoralle auringonvalolle altistuminen edistää auto-oksidaatiota. Levopimaarihappo reagoi helposti maleiinihappoanhydridin ja p-bentsokinonin kanssa. Koska levopimaarihappo isomeroituu lähellä sulamispistettä, sen sulamispiste ei ole terävä 150 celsiusasteessa, ja siksi sulamispiste ei ole puhtauden kriteeri. Yhdisteen ominaiskierto on siten parempi puhtauden määrittämisestä.

Levopimaari- ja palustriinihapot suojaavat puuta juurikäävältä ja sen sukuisilta lahottajasieniltä.³⁷ Nämä hartsihapot ovat kuitenkin epästabiileja ja hapettuvat helposti abietiini- ja dehydroabietiinihapoksi. Vähitellen myös suurin osa abietiinihaposta hapettuu dehydroabietiinihapoksi ilman vaikutuksesta. Abietiinihapon on arveltu olevan dehydroabietiinihapon prekursori. Myös 7-okso-dehydroabietiinin on osoitettu olevan aktiivinen estämään juurikäävän sukuisia lahottajasieniä.

Dehydroabietiinihapon johdokset ovat osoittaneet esimerkiksi vatsahaavaa, mikrobeja, viruksia ja syöpää estävää, ahdistusta lievittävää ja sytotoksista vaikutusta.³⁸ Dehydroabietiinihappo ja eräät sen johdannaiset ovat kemiallisia modulaattoreita, erityisesti kalsiumilla aktivoitavan BK-kanavan avaajia. Tämä piirre tekee dehydroabietiinihapon uuden perusrakenteen esimerkiksi epilepsian, astman ja korkean verenpaineen hoitoon tarkoitetuille yhdisteille. Lisäksi dehydroabietiinihapolla on havaittu olevan ominaisuuksia, jotka vahvistavat eräiden lääkkeiden syöpää ehkäisevää aktiivisuutta. Joidenkin dehydroabietaanihappojohdoksien on todettu ehkäisevän homesieni *Aspergillus*.

Puhdas neoabietiinihappo valmistetaan hartsihapposeoksista muun muassa käyttämällä amiinisuolajohdannaisia.³³ Hapon lisääminen neoabietiinihappoon aiheuttaa isomeroitumisen seokseksi, jonka määrällisesti suurin yhdiste on abietiinihappo. Kun abietiinihappoa kuumennetaan inertissä ilmakedässä, syntyy neoabietiinihappoa. Yhdiste on suhteellisen stabiili ilmassa ja valossa. Neoabietiinihappoa käytetään alkueliöiden torjunta-aineena.³⁹

Pimaarihappo eristettiin ensimmäisen kerran vuonna 1874.³³ Kuten isopimaarihappokin, se on hieman haihtuvampaa kuin muut hartsihapot. Se voidaan kiteyttää natriumsuolana. Kiteisenä se ei liukene veteen, mutta on erittäin liukoinen dietyylieetteriin, pyridiiniin ja etanoliin.⁴⁰ Pimaarihappo on antimikrobinen yhdiste, kuten sandarakopimaarihappokin.³⁹ Lisäksi sandarakopimaarihapolla on syöpää ehkäisevää vaikutusta.¹⁹

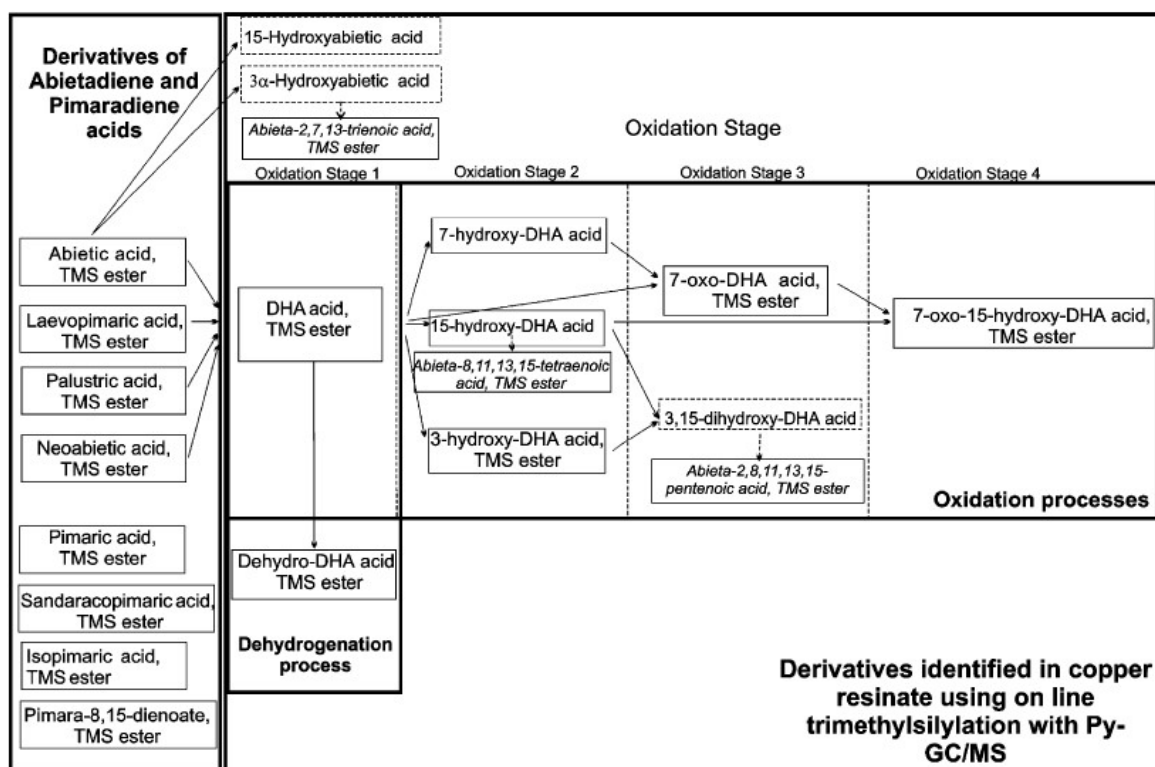
Smith *et al.*⁴¹ analysoivat euroopanmustamännystä eristetyn isopimaarihapon aktiivisuutta monille lääkkeille resistenttien (MDR)-kantojen, metisilliiniresistenttien *Staphylococcus aureus*-bakteerikantojen (MRSA) ja epideemisesti metisilliiniresistenttiä *Staphylococcus aureus*-kanta (EMRSA) avulla.⁴¹ Abietiinihapon lisäksi verrokkeina olivat antibiootit: tetrasykliini, norfloksasiini, erytromysiini ja oksasilliini. Isopimaarihappo ja abietiinihappo havaittiin vastustuskykyiseksi kaikkia tutkittuja kantoja vastaan. Abietiinihapon aktiivisuus oli hieman heikompi kuin isopimaarihapon.

3.2 Hartsihappojen hajoaminen ja hapettuminen

Alla olevasta kuvasta 16 voidaan havaita, miten abietadienityyppiset hartsihapot hapettuvat.⁴³ Tästä on esimerkkinä kupariresinaattivernissan hajoamisen tutkimus pyrolyysi-kaasukromatografi-massaspektrometrilla (Py-GC-MS), jossa käytettiin heksametyylidisilatsaani- eli HMDS-trimetyylisilylaatiota. Kuvasta voidaan todeta abietaanien neljä hapettumistasoa. Abietiinihapon hajaantumisen tuloksena on havaittu 15-hydroksiabietiinihapon ja 3 α -hydroksiabietiinihapon muodostuminen.

Yhtä lailla abietaaniditerpenoidihappojen dehydrogenaatioprosessissa syntyy dehydroabietiinihappoa.⁴³ Dehydroabietiinihappo voi läpikäydä uuden dehydrogenaatioprosessin muodostaen dehydrodehydroabietiinihappoa. Vaihtoehtoisesti dehydroabietiinihappo voi hapettua 7-oksodehydroabietiinihapoksi muodostamalla peroksidin lähelle kaksoissidoksen veden lohjetessa reaktiossa. On myös mahdollista, että muodostuu hydroksidehydroabietiinihappoa, kun välituotteen peroksidi pelkistyy.

Edellä mainittujen lisäksi on olemassa myös muunlaisia reaktioita, joissa dehydroabietiinihappo hapettuu useiksi yhdisteiksi, muun muassa 3,15-dihydroksi-dehydroabietiinihapoksi ja 7-okso-15-hydroksidehydroabietiinihapoksi.⁴³ Kuvan 16 mukaan pimaradienihapot eivät hapetu samalla tavoin kuin abietadienihapot.



Kuva 16. Kupariresinaattivernissan abietadieni- ja pimaradienihappojen trimetyylisilyylijohto- ja hajoamistuotteet Py-GC-MS-tutkimuksessa, jossa käytettiin HMDS-trimetyylisilylaatiota.⁴³

3.3 Hartsihapot sulfaattiselutehtaan mustalipeässä ja prosessivesissä

Sulfaattiselutehtaissa hartsihapot sekä muut diterpenoidit, rasvat, rasvahapot, steryyliesterit ja sterolit hydrolysoidaan alkalisella hydrolyysillä, jolloin muodostuu mäntyöljysuopaa ja neutraaleita yhdisteitä, jotka eivät saippuoidu.²³ Neutraaleihin yhdisteisiin luetaan kuuluvaksi sterolit, triterpenyylialkoholit, diterpeenialdehydit ja -alkoholit, rasva-alkoholit ja terpenoidihiilivedyt. Keittoprosessin jälkeen raakasuopa voidaan erottaa mustalipeän pinnalta. Haihtuvat yhdisteet, muun muassa mono- ja seskviterpeenit, lauhdutetaan ja otetaan talteen raakatärpättinä.⁴⁴

Kun vesikiertoja on suljettu paperi- ja selutehtaissa, ovat myös ongelmat lisääntyneet prosessivesissä.⁴⁵ Näitä ongelmia aiheuttavat muun muassa jätevesiin kertyneet hartsi- ja rasvahapot. Tuloksena on huonolaatuista sellua, prosessivesien vaahtoamista, pahaa hajua ja jätevesien myrkkypitoisuuksien lisääntymistä.

Biologinen jätevedenkäsittely ilmastusaltaissa on yleinen tapa käsitellä jätevesiä.⁴⁶ Tämänkaltaisissa systeemeissä useiden bakteerilajien on havaittu käyttävän hartsihappoja elatusaineenaan.

Eräiden bakteereiden puhtasviljelmät kykenevät käyttämään dehydroabietiini- tai isopimaarihappoa ainoana hiililähteenään.⁴⁷ Pimaraanien kaltaiset hartsihapot eivät samalla tavoin ole suosittuja hiililähteitä kuin abietaanit.

Taulukosta 6 voidaan havaita bakteereja ja sieniä, jotka käyttävät hartsihappoja kasvuunsa.⁴⁷ Pois lukien bakteerisuvut *Arthobacter sp.* ja *Bacillus sp.* taulukossa esiintyvät bakteerit ovat gram-negatiivisia. Kuitenkin vanhemmiten eräät *Bacillus* -suvun lajit saattavat muuttua gram-positiivisista gram-negatiivisiksi.⁴⁸

Taulukko 6. Hartsihappoja hyödyntävät sienet ja bakteerit⁴⁷

	Bioactivity ^a	Ref.
Bacteria		
<i>Bacillus</i> sp.	DHA utilization	Hemingway and Greaves 1973
<i>Escherichia coli</i>	DHA utilization	Hemingway and Greaves 1973
<i>Flavobacterium</i> sp.	DHA utilization	Hemingway and Greaves 1973
<i>Flavobacterium resinovororum</i>	DHA utilization	Biellmann et al. 1973a
<i>Pseudomonas</i> sp.	DHA utilization	Hemingway and Greaves 1973
	DHA utilization	Biellmann et al. 1973b
	DHA, ABA, and IPA utilization	Wilson et al. 1996
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	DHA utilization	Biellmann et al. 1973b
<i>Arthobacter</i> sp.	DHA (methyl ester) utilization	Levinson et al. 1968
<i>Sphingomonas</i> sp.	DHA, ABA, and PAL utilization	Mohn 1995
<i>Zooglea</i> sp.	DHA, ABA, and PAL utilization	Mohn 1995
<i>Comamonas</i> spp.	ABA, DHA, NAA, PA, IPA, and LPA utilization	Morgan and Wyndham 1996
<i>Alcaligenes</i> spp.	ABA, DHA, NAA, PA, IPA, and LPA utilization	Morgan and Wyndham 1996
Gram-negative strains	Abietane utilization	Bicho et al. 1994
Fungi		
<i>Mortierella isabellina</i>	Resin acid hydroxylation	Kutney et al. 1981a, 1985, 1988
<i>Chaetomium cochlioes</i>	DHA hydroxylation	Yano et al. 1994, 1995a, 1995b
<i>Corticium sasaki</i>	DHA (methyl ester) hydroxylation	Brannon et al. 1968
<i>Fomes annosus</i>	DHA oxidation	Ekman and Sjöholm 1979

^aDHA, dehydroabietic acid; ABA, abietic acid; PAL, palustric acid; NAA, neoabietic acid; PA, pimaric acid; IPA, isopimaric acid; LPA, levopimaric acid.

DHA = dehydroabietiinihappo, ABA = abietiinihappo, PAL = palustriinihappo, NAA = neoabietiinihappo, PA = pimaarihappo, IPA = isopimaarihappo LPA = levopimaarihappo

Erytisesti dehydroabietiinihappo on niin mikrobien kuin sienien suosiossa. *Comamonas*- ja *Alcaligenes*- suvut kykenevät käyttämään sekä abietaaneja että pimaraaneja hyödykseen.

Taulukkoon 7 on kerätty hartsihappojen ominaisuuksia liittyen vesiliuoksiin.⁴⁹

Taulukko 7. Yhteenvedo havupuiden hartsihappojen ominaisuuksista⁴⁹ K_{ow} = oktanoli-vesi jakosuhte, BFC = biokertyvyyskerroin, pK_a = happodissosiaatiovakio

Yhdiste	log K_{ow} pH 7	BCF pH 7	pK_a	Liukoisuus veteen mg/l	Vesikirppu LC_{50}^* mg/l	Bakteeri EC_{50}^{**} mg/l
Abietiinihappo	6,54	240	4,64	2,75	1,00	7,3
Dehydroabietiinihappo	6,35	181	4,66	5,11	1,89	17,2
Levopimaarihappo	6,55	266	4,67	2,54	0,75	9,0
Neoabietiinihappo	6,67	331	4,67	2,31	0,56	8,0
Palustriinihappo	6,65	303	4,65	2,41	0,55	7,9
Pimaarihappo	6,60	291	4,67	2,17	0,54	7,0
Isopimaarihappo	6,61	278	4,64	1,70	0,26	17,9
Sandarakopimaarihappo	6,60	291	4,67	1,82	0,31	8,2

* LC_{50} - arvot vesikirppuille (*Daphnia magna*), altistus 24 h (Peng & Roberts 2000).

** EC_{50} - arvot bakteereille (*Vibrio fischeri*), 15 ja 30 min keskiarvona (Rigol ym. 2004)

Kun K_{ow} -arvo on hartsihapoilla yhtä suuri kuin tai ylittää raja-arvon 4, ovat hartsihapot ovat niin lipofiilisiä, että ne voivat olla myös biokertyviä.⁵⁰ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1272/2008 eli CLP-asetuksen mukaan kokeellisesti määritetty BCF kalalle mittaa ominaisuutta paremmin. Yhdiste on luultavasti biokertyvä, jos kalan BCF on yhtä suuri tai suurempi kuin 500. Taulukon mukaan hartsihapot ovat edellä mainitun raja-arvon alapuolella, joten biokertyvyys ei ole todennäköistä.

Kivisaaren mukaan⁴⁹ eroavaisuudet hartsihappojen rakenteissa vaikuttavat niiden vesiliukoisuuteen ja myrkyllisyyteen, jolloin liukoisimmat hartsihapot ovat vähiten myrkyllisiä. Taulukon 7 mukaan isopimaarihappo on hartsihapoista toksisin vesikirpuille ja sen vesiliukoisuus alhaisinta. Vastaavasti dehydroabietiinihappo liukenee kolminkertaisesti sen mitä isopimaarihappo, mutta vesikirppujen kuolleisuus on seitsemänkertaisesti pienempi. Kivisaaren mukaan⁴⁹ hartsihappojen väliset liukoisuuserot eivät kuitenkaan ole niin suuret, että eroavaisuuksia myrkyllisyydessä voitaisiin selittää pelkästään niiden perusteella. Kuitenkin *Vibrio fischeri* myrkyllisyydestien tulokset isopimaari- ja dehydroabietiinihapolle olivat samansuuruisia.

3.4 Lignaanit

Lignaanit ovat fenyylipropaanin johdoksia.⁸ Ne eivät haihdu helposti, ja niillä on kiteinen olomuoto. Lignaaniin maku voi olla karvas tai polttava. Ne muodostuvat koniferyylialkoholista, koniferiinista, sinapiinialkoholista ja/tai syringiinistä tai niiden derivaatoista. Lignaaniin muodostumistapa on kondensoituminen. Lignaani syntyy, kun 1-fenyylipropaaniyksikköjen β -hiilien väliin kehkeytyy 8-8 sidos. 2-5 fenyylipropanoidiysikköä käsittävät lignaanit voivat muodostaa seskvi- ja dilignaaneja sekä litospermihappoa. Lignaanit ovat kiraalisia yhdisteitä, ja yksi enantiomeeri vallitsee kustakin lignaaniyhdisteestä.⁵¹

Kuusen haavapihkasta on eristetty pinoresinolia, (+)-epipinoresinolia, larisiresinolia, (+)-isolarisiresinolia ja sekoisolarisiresinolia.³⁰ Haavoittamattomasta puusta saadut lignaanit eroavat joiltakin osin edellä mainituista: 3,4-divanillyylitetrahydrofuraani, α -konidendriini, hydroksimatairesinoli, allohydroksimatairesinoli, ketomatairesinoli, larisiresinoli, lioviili, matairesinoli ja pinoresinoli.

Enantiomeerisesti lignaanit voivat esiintyä enantiomeeriseoksina riippuen kasvilajista.⁵² Eräitä laajasti tutkittu lignaaneja ovat pinoresinoli, larisiresinoli, sekoisolarisiresinoli ja matairesinoli. Nämä lignaanit esiintyvät joko enantiomeerisesti puhtaina yhdisteinä tai enantiomeerisinä seoksina.

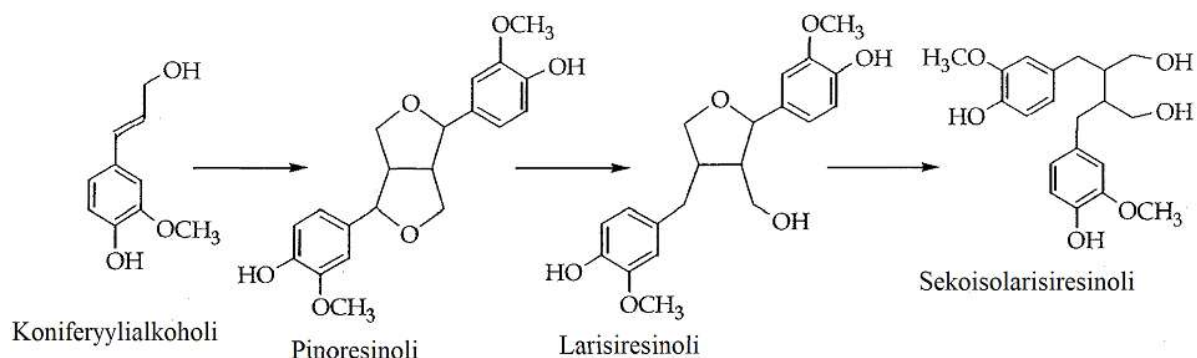
Pohjoisella pallonpuoliskolla lähellä arktista kuusen puurajaa oksat ovat pienempiä ja todennäköisesti raskaammassa lumikuormassa.²⁶ Tämä tilanne voi kasvattaa lignaanipitoisuutta oksankohdissa. Siten lignaanipitoisuus on pienempi etelässä kuin pohjoisessa. Kasvuolosuhteet eivät ole yhtä suotuisat arktisella puurajalla, mikä saattaa johtaa suurempaan lignaanituotantoon ja siten puun ympäristön aiheuttaman stressin sietokyvyn kasvuun.

Hydrofiiliset uuteaineet, lignaanit, voidaan myöhemmin uuttaa polaarisella liuottimella esimerkiksi asetonilla, metanolilla tai etanolilla.⁵³ Kun lisätään 5–10 prosenttia vettä liuottimeen, parannetaan liotuskykyä ja edistetään polaarisempien yhdisteiden, kuten lignaanien glykosidien, uuttumista. Eräät lignaanit ovat polariteetiltaan alhaisia tai keskitasoisia, ja näitä yhdisteitä voidaan uuttaa polaarittomalla liuottimella. Monimutkainen yhdisteseos, lignaaniryhmä tai hartsihapposeos voi vaikuttaa tiettyjen yhdisteiden liukoisuuteen ja selektiivisyyteen, minkä seurauksena voi valikoitua polaariton liuotin.

Uuttoliuottimien, kuten veden, asetonin, etyyliasetaatin, metanolin, etanolin ja propanolin sekä niiden seoksien, valinnalla on osoitettu olevan vaikutusta saantoon.⁵⁴ Korkean erotuskyvyn nestekromatografi (HPLC) valodiodirividetektorilla (PDA) ja tandemmassaspektrometrilla (MS/MS) varustettuna on mahdollistanut kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen lignaanien määrityksen. Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria-menetelmä kehitettiin neljän suurimman enterolignaanin prekursorin, sekoisolarisiresinolin, matairesinolin, larisiresinolin, ja pinoresinolin, kvantitatiiviseen tutkimiseen ravinnosta.⁵⁵

Matairesinolilla, sekoisolarisiresinolilla ja sekoisolarisiresinolidiglykosidilla on todettu olevan syöpäriskiä alentavaa vaikutusta rinta-, eturauhas- ja paksusuolen syövässä.⁸ Ruuansulatuksen aikana suolistobakteerit muuntavat kasvilignaaneja, sekoisolarisiresinolia ja matairesinolia, enterodioliksi ja enterolaktoniksi.⁵⁶ Matairesinolin ja sekoisolarisiresinolin lisäksi myös useammat lignaanit, muun muassa pinoresinoli ja larisiresinoli, kykenevät muodostamaan enterodiolia ja enterolaktonia *in vitro*.⁵⁷

Kuvasta 17 voidaan havaita, miten pinoresinoli, larisiresinoli, sekoiolarisiresinoli ja matairesinoli ovat yhteydessä toisiinsa.⁵¹



Kuva 17. Lignaani biosynteettinen polku koniferyylialkoholista sekoiolarisiresinoliin.⁵¹

Jotta pinoresinolia muodostuisi kahdesta koniferyylialkoholimolekyylistä, reaktion aikaansaamiseksi tarvitaan dirigentproteiini, lakkaasientsyymi ja vetyperoksidi.⁵¹ Dirigentproteiinin koko on 78 kDa, ja sen tarkoitus on liittää toisiinsa enantioselektiivisesti lakkaasientsyymien muodostamat kahden koniferyylialkoholimolekyylin radikaalit välituotteet. Lakkaasientsyymi on oksidaasientsyymi, joka toimii yksielektronisena hapettimena. Pinoresinoli pelkistyy pinoresinoli/larisiresinoli -reduktaasin avulla ensin larisiresinoliksi ja sitten sekoiolarisiresinoliksi.

Larisiresinoli ja pinoresinoli eristetään pihkasta muodostamalla kalium- tai natriumsuoloja, jotka ovat niukkaliukoisia vahvoihin emäksiin ja etanoliin.³⁰ Jotkin lignaanit kiteytyvät kiteytysliuoksesta. Uudelleenkiteytys useammasta kuin yhdestä liuottimesta on normaali puhdistusmenetelmä, ja pienet määrät epäpuhtauksia voidaan poistaa joko suodattamalla kloroformi- tai eetteriliuoksesta alumiinioksidikerroksen läpi tai regeneroimalla emolignaani asetyyli johdoksista.

3.4.1 Pinoresinoli

Pinoresinolia saadaan *Pinus*- ja *Picea*- lajien pihkasta.³⁰ Pinoresinoli on antioksidantti ja syklisten adenosiinimonofosfaattifosfodiesteriäsin inhibiittori.³⁹

Pinoresinolin sulamispiste on 121–122 °C ja ominaiskiertokyky $[\alpha]_D +84^\circ$ liuottimena asetoni.³⁰ Rikkihappo antaa ruskean värireaktion pinoresinolin kanssa. Lisäksi dimetyylieetteri ja pinoresinoli muodostavat punaisen liuoksen. Pinoresinolin kaliumsuola on liukenematon vahvaan alkaliseen liuokseen ja etanoliin. Paulyn reagenssi antaa punaisen värireaktion pinoresinolille.

Vapaita fenolisia hydroksyyliiryhmiä sisältävät lignaaneja, kuten pinoresinolia, voidaan saostaa alkoholiuutteista kylläisellä kaliumhydroksidiliuoksella.⁵⁸ Kaliumsuoloja liukoisemmat natriumsuolat on mahdollista uutaa suoraan kasvimateriaalista natriumhydroksidivesiliuokseen, mitä seuraa liuoksen happamoittaminen ja uutto orgaanisella liuottimella. Koviin happamia tai emäksisiä olosuhteita ei suositella.

3.4.2 Larisiresinoli

Larisiresinolin sulamispiste on 167–168 °C ja ominaiskiertokyky $[\alpha]_D +19,7^\circ$ liuottimena asetoni. Paulyn reagenssin kanssa antaa punaisen värin.³⁰ Larisiresinolin kaliumsuola on liukenematon vahvaan alkaliliuokseen ja etanoliin. Larisiresinoli muodostaa isolarisiresinolia happamassa liuoksessa.⁹ (+)-larisiresinoli ja (-)-larisiresinoli ovat fytotoksisia.⁵²

3.4.3 Sekoisolarisiresinoli

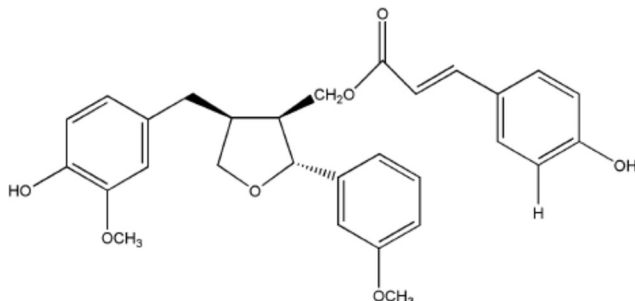
Sekoisolarisiresinolilla on kaksi *trans*-isomeeriä, (+)-sekoisolarisiresinoli, (-)-sekoisolarisiresinoli ja yksi *cis*-isomeeri, meso-isolarisiresinoli.⁵⁹ Sekoisolarisiresinolit ovat esiasteita enterolignaaneille, jotka muodostuvat suolistossa sijaitsevien bakteerien myötävaikutuksella.⁶⁰

Sekoisolarisiresinoli liittyy usein sokereihin, mikä on tyypillistä lignaaneille.⁶⁰ Tällainen yhdiste on muun muassa pellavassa esiintyvä sekoisolarisiresinolidiglukosidi. Siksi analysoitaessa edellä mainittua yhdistettä se aluksi käsitellään hapolla, jotta sokerien ja yhdisteen sidokset katkeaisivat. Sekoisolarisiresinoliglykosidi voi olla osa isompaa rakennetta, lignaanimakromolekyyliä. Tämä makromolekyyli voi muodostua lignaanin lisäksi esimerkiksi glutaarihaposta, 4-hydroksikanelihappoglukosidista, ja ferulihappoglukosidista.⁵⁷ Sekoisolarisiresinolin sulamispiste on 112,5–113,5 °C ja ominaiskiertokyky $[\alpha]_D -35,6^\circ$ liuottimena asetoni.³⁰ Sekoisolarisiresinoli muodostaa keltaisen värin Pauly'n reagenssin kanssa.

Sugahara *et al.*⁵⁹ osoittivat, miten isomeerit ovat toisiinsa nähden vaikuttavuudeltaan erilaisia. Tutkimuksessa sekä (+)-sekoisolarisiresinoli ja (-)-sekoisolarisiresinoli kiihdyttivät immunoglobuliini M:n (IgM) tuotantoa, mutta meso-muodolla ei ollut vaikutusta. Vain meso-muoto osoitti sytotoksista aktiivisuutta.

3.4.4 Larisiresinolikumaraatti

Kuvassa 18 on esitetty larisiresinolikumaraatti.



Kuva 18. (+)-larisiresinolikumaraatti.⁶¹

Hydroksikanelihappoyhdisteet esiintyvät useimmiten yksinkertaisina estereinä hydroksikarboksyylihappojen tai glukoosin kanssa.⁶² Fenolihapot voivat esiintyä kasveissa estereinä tai glykosideina yhdistyneinä esimerkiksi flavonoideihin, alkoholeihin, rasvahappoihin, steroleihin ja glukosideihin.

Kuusen pihkan lisäksi larisiresinolikumaraattia on havaittu muun muassa Pohjois-Amerikassa esiintyvän mustakuusen (*Picea marina*) kävyissä, joista Cree-heimoon kuuluvat alkuperäisasukkaat valmistivat anti-inflammatorista lääkettä hoitamaan tyypin 2 diabetesta.⁶¹ Muut Kanadan alkuperäiskansat käyttivät lääkettä suu- ja ihosairauksiin. B. Walshe-Roussel⁶¹ havaitsi, että (+)-larisiresinoli-9'-p-kumaraatti oli ainoa eristetty yhdiste, joka osoitti anti-inflammatorista aktiivisuutta. Tällä yhdisteellä oli tuumorinekroositekijä alfan salpaamiskykyä esittävä IC₅₀ 28,4 µM. Myös havaittiin, että etanoliutteiden anti-inflammatorinen teho oli 1,8-kertainen verrattuna vesiuutteisiin. Tutkimus oli tehty preparatiivisella HPLC:lla ja larisiresinolikumaraatin tunnistus oli tehty ydinmagneettisella resonanssispektroskopiolla (NMR).

3.5 Hydroksikanelihapot

Hydroksikanelihapot vaikuttavat biologisesti useilla eri tavoilla, muun muassa antioksidanttisesti, antimikrobisesti, antiallergisesti, antimutageenisesti ja immuunipuolustusta säättävänä tekijänä.⁶³ Ne voivat myös vuorovaikuttaa proteiinimolekyyleihin ja aiheuttaa joitakin rakenteellisia ja toiminnallisia muutoksia. Eräitä tavallisimmista luonnossa esiintyvistä hydroksikanelihapoista ovat 4-hydroksikanelihappo, ferulahappo ja kahvihappo, joita voidaan tavata myös kuusen kalluspihkassa.⁹

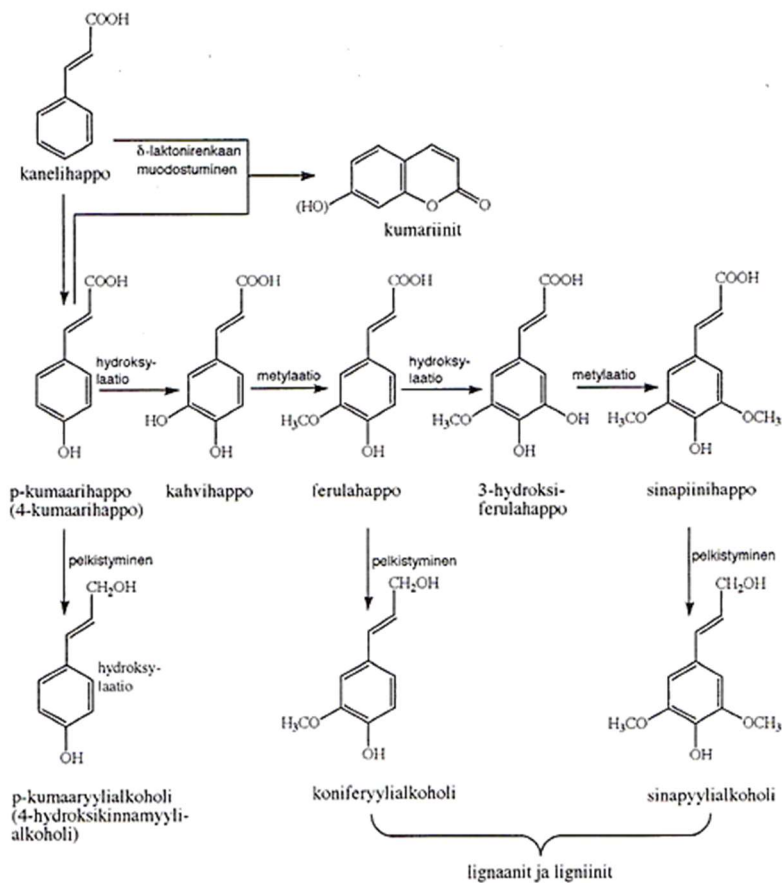
Hydroksikanelihappoja voidaan tavata vapaina, mutta useimmiten ne ovat yhdistyneet entsyymaattisen hydroksylaation, O-glykosylaation, O-metylaation tai esteröinnin avulla.⁶³ Biologiset vaikutukset määräytyvät voimakkaasti hydroksikanelihapoissa esiintyvien hydroksyyliyhjmiien määrän ja paikan mukaan.

Omena-, viini-, sikkimi- ja glukariinihappo voivat yhdistyä hydroksikanelihappojen kanssa esteröitymisreaktion avulla.⁶⁰ Hydroksikanelihappoja on löydetty kasveissa esiintyviin yhdisteisiin liittyneenä, kuten alkoholeihin, hydroksirasvahappoihin, terpeenialkoholeihin, steroleihin, triterpenoideihin, ligniineihin sekä fenolien ja sykloheksanoliien glykosideihin. Luonnossa 4-hydroksikaneli- tai kahvihappo on pääasiällisin asyyliyhjä O-asyloiduissa flavonoidiglykosideissa.

Luonnossa 4-hydroksikanelihappoa muodostuu kahdella tapaa. Kun lähtöaineena on L-fenyylialaniini, saadaan fenyylialaniini-ammonialyaasientsyymin avulla kanelihappoa.^{8,64} Reaktiossa vapautuu ammoniakkia. Kanelihaposta muodostuu tuotteeksi 4-hydroksikanelihappoa kanelihappo-4-hydroksylaasientsyymin katalysoimana. Reaktio on hapetus-pelkistysreaktio, johon osallistuu myös NADPH ja happimolekyyli. Reaktiossa NADPH hapetuu NADP⁺:ksi ja lisäksi lohkeaa vettä. Toisessa tavassa lähtöaine on L-tyrosiini, josta saadaan 4-hydroksikanelihappoa tyrosiiniammonialyaasin toimiessa katalyyttina. Myös tässä reaktiossa muodostuu ammoniakkia.

4-hydroksikanelihappo toimii antioksidanttina, alentaa matalan tiheyden lipoproteiinin peroksidaatiota ja vähentää vatsasyövän riskiä.⁶⁵ Kyseessä oleva yhdiste isomeroituu *cis*-muotoon ultravioletti- eli UV-valon vaikutuksesta.⁶⁶ Tämä fotoisomerisoituminen on 4-hydroksikanelihapolle vesiliuoksessa reversiibeli.⁶⁷ Hydroksikanelihappoja voidaan uutaa vedellä, mutta myös orgaanisia liuottimia, kuten etanolia, metanolia, asetonia ja kaikkien edellä mainittujen liuottimien seoksia, on käytetty.⁶⁸

Kuten kuvasta 19 voidaan havaita, kaneli- ja 4-hydroksikanelihappo sekä niiden johdannaiset ovat prekursoreina monille kasvien yleisimmistä aromaattisista yhdisteistä, kuten kumariineille, lignaaneille, ligniineille ja flavonoideille.⁸



Kuva 19. Kanelihappo yksinkertaisten aromaattisten yhdisteiden, kumariinien ja flavonoidien esiasteena.⁸

4 Kuusen pihkan prosessointi

Kuusen pihka kerätään keväisin ja syksyisin, jolloin pihkan koostumus on sopivaa keräämiseen.⁶⁹ Noin puolet kerätystä materiaalista on aitoa kuusen pihkaa. Repolar hankkii vuosittain n. 1000 kg pihkaa, joka uutetaan Kolarintehtaalla. Uute toimitetaan Liljendaliin Loviisaan, jossa Teampac Oy tekee erilaisia pihkavalmisteita.⁷⁰

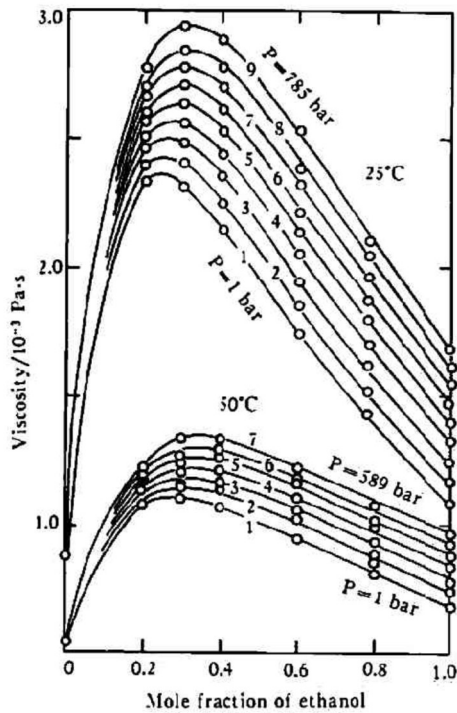
4.1 Etanoli

Etanoli on hygroskooppinen ja yleensä stabiili liuos.⁷¹ Se on veteen, eettereihin, ketoneihin, hiilivetyihin, happoihin, estereihin, glykoleihin, muihin alkoholeihin ja useisiin muihin orgaanisiin liuottimiin liukeneva. Voimakkaat hapettimet, kuten kromitrioksidi, kloorin oksidit, typpihappo, perklooraatit ja permanganaatit saavat etanolin reagoimaan kiivaasti aikaansaaden palo- ja räjähdysvaaran. Vetyperoksidi, alkalimetallit, nitraatit, perkloorihappo, hapot, happoanhydritit, kalsiumhypokloriitti, hopeaoksidi, bromidit ja ammoniakki aiheuttavat etanolin kanssa myös vastaavat vaaramomentit. Etanoli syttyy herkästi lämmön, kipinöiden ja liekkien vaikutuksesta, ja se palaa helposti. Etanolihöyry voi muodostaa syttyvän seoksen ilman kanssa yli 13 °C lämpötiloissa. Etanolin kiehumispiste on 78,5 °C. Etanoli ei ole allergeeni eikä se ole iholle tai kudokselle vahingollinen.⁷² Etanoli on nopeasti haihtuva, stabiili ja metalleja ruostuttamaton neste.

4.1.1 Etanoli-vesiseoksen viskositeetti

Virtaavan aineen viskositeetilla ilmaistaan taipumusta vastustaa vierekkäisten ainekerrosten välisiä siirtymiä.⁷³ Viskositeetilla ilmennetään virtaavan aineen sisäistä kitkaa. Dynaaminen viskositeetti on virtausaineen ominaisuus, joka on riippuvainen lämpötilasta ja paineesta. Dynaamisen viskositeetin yksikkö on Pas.

Nestekerrosten välisten molekyylien koheesivoimat vaikuttavat siten, että nesteiden viskositeetti alenee lämpötilan noustessa. Etanoli-vesiseoksien viskositeetti on esitetty eri paineille 25 ja 50 °C lämpötiloissa kuvassa 20.



Käyräparvien numeroiden selitykset:

- 1: 1 bar; 2: 98 bar; 3: 196 bar; 4: 294 bar;
 5: 392 bar; 6: 490 bar; 7: 589 bar; 8: 686 bar;
 9: 785 bar

Kuva 20. Etanoli-vesiliuoksen dynaamisen viskositeetin riippuvuus lämpötilasta ja paineesta etanolin mooliosuuden funktiona. Korkeampi käyräparvi on mitattu 25 ja matalampi 50 celsiusasteessa.⁷⁴

Kuvasta 20 voidaan havaita viskositeetin olevan suurimmillaan etanolin mooliosuuksilla 0,2–0,4 niin 25 kuin 50 celsiusasteessa. Lämpötilan nousu ja alhainen paine alentavat etanoli-vesiseoksen viskositeettia. Lämpötilan nostamisella on merkittävä vaikutus viskositeetin alenemiseen. Alimmillaan etanoli-vesiseoksen viskositeetti on etanolin mooliosuuksilla 0–0,1 ja 0,8–1,0, paineessa 1 bar ja lämpötilassa 50 celsiusastetta.

4.1.2 Etanoli-vesiseoksen polaarisuus

Ionin ja liuottimen välisten vuorovaikutusten voimakkuuksista kuvaa dielektrisyysvakio eli suhteellinen permittiivisyys (ϵ). Hyvän liuottimen dielektrisyysvakion arvo on 30 tai enemmän.⁷⁵

Etanoli liuottaa sekä kationeja että anioneja.⁷⁶ Elektrostaattiset vuorovaikutukset negatiivisten sigmasidoksellisten happiatomien kanssa voivat stabiloida positiivisia ioneja, kun taas positiivisen sigmasidoksen omaavat vetyatomit voivat stabiloida negatiivisia ioneja. Etanoli on siten polaarinen liuotin. Kuten vesi, etanoli on proottinen liuotin, koska etanolilla on sigmasidoksellisia protoneita, jotka vuorovaikuttavat anionien kanssa.

Reaktiot, joissa käytetään polaarisia proottisia liuottimia, ovat erittäin hitaita verrattuna aproottisten polaaristen liuottimien reaktioihin.⁷⁷ Esimerkiksi aproottiseen asetoniin rinnastettuna etanoli on siis huomattavasti hitaampi reagoidessaan liuotteen kanssa. Aproottisissa polaarisisa liuottimissa positiivisesti varattu vastaioni liukenee ja jossain määrin erottuu anionista. Anioni ei puolestaan liukene eikä stabiloidu, joten se voi reagoida helpommin. Proottisissa polaarisisa liuoksissa anioni liukenee ja stabiloituu reaktiivisuuden samalla vähetessä. Aproottisissa polaarisien liuottimien reaktiot ovat nopeita, sillä reaktioon tarvitaan pieni aktivaatioenergia.

Alla oleva taulukko 8 antaa joidenkin liuottimien dielektriset vakiot. Mitä suurempi vakio, sitä polaarisempi liuotin on.

Taulukko 8. Joidenkin tavanomaisten liuottimien dielektriset vakiot⁷⁶

Polaariset proottiset liuottimet	ϵ	Polaariset aproottiset liuottimet	ϵ	Ei-polaariset liuottimet	ϵ
vesi	80	DMSO	47	kloroformi (CHCl ₃)	4,8
metanoli	33	DMF	38	dietyylieetteri	4,3
etanoli	25	asetonitriili	38	tolueeni	2,4
etikkahappo	6	asetoni	21	bentseeni	2,3
		dikloorimetaani	9,1	sykloheksaani	2
		tetrahydrofuraani (THF)	7,5	heksaani	1,9
		etyyliasetatti	6	pentaani	1,8

Taulukosta voidaan huomata, että vesi-etanoliseoksissa vesi lisää seoksen polaarisuutta.⁷⁸ Etanolin dielektrinen vakio on 25, jolloin ionidissosiaatiota tapahtuu jossain määrin, mutta vallitsevinta on ionipariutumisen.⁷⁹

4.1.3 Etanoli-vesiseoksen kemiallisia reaktioita

Etanolin olisi mahdollista esteröityä hartsihappojen kanssa hartsihappojen sisältämän karboksyylihapporyhmän vuoksi.⁷⁶ Esteröityminen on mahdollista happamissa olosuhteissa, jolloin happamassa liuoksessa olevat protonit katalysoivat reaktiota. Ilman katalyyttia reaktio on hidas.⁷⁶ Pihkautteen hartsihappojen esteröinnissä katalyyttina voisivat toimia mahdollisesti joko happamat fenolit tai mahdollisesti kuoren tanniinit. Tyypillisesti esteröintireaktiossa lohkeaa vettä. Esteröintireaktio on reversiibeli, jolloin emäksiset olosuhteet saavat syntyneen esterin hydrolysoitumaan.⁷⁶

Hartsihappojen trisyklisen hydrofenantreenirakenteen steerinen este on syynä karboksyylihapporyhmän huonoon reaktioherkkyyteen, jolloin korkea lämpötila, korkea paine tai katalyytti olisivat välttämättömiä reaktiolle.³¹ Hartsihappojen karboksyyli-ryhmä on myös kiinni tertiäärisessä hiiliatomissa, ja siksi se on steerisesti esteellinen. Tätä seikkaa on käytetty hyväksi hartsihappojen eristämiseksi paljon helpommin erottuvista rasvahapoista.³⁰

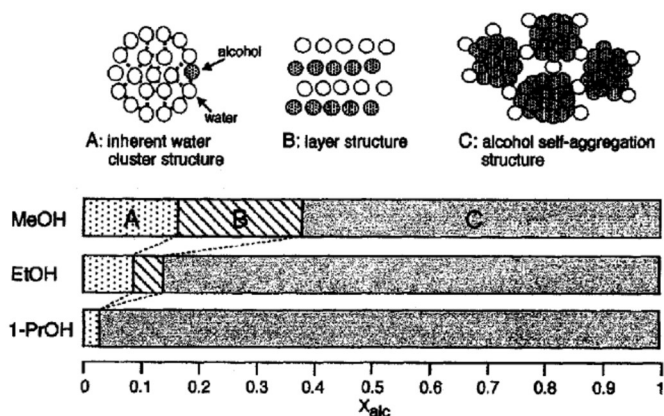
Vesi-etanoliseokset ovat poikkeavia tiettyjen ominaisuuksiensa suhteen. Runsaasta tutkimustyöstä huolimatta poikkeavuuksien alkuperä ja mikroskooppinen rakenne ovat edelleen tuntemattomia.⁸⁰ Vaikka vesi ja etanoli hyvin toisiinsa sekoittuvia, muodostunut liuos ei kuitenkaan ole täysin tasakoosteinen, vaan sisältää vesi-, etanoli- ja vesi-etanoliryhmiä.⁸¹ Veden lisääminen lisää myös huomattavasti vetysidoksellisia alkoholin OH-sidoksia. Tästä huolimatta etanoli ja vesi eivät sekoitu täysin toisiinsa. Veden lisäyksen jälkeen vetysidos vahvistuu, mikä johtuu etanolihydroksyyli-ryhmistä. Nämä lisääntyneet vetysidosvuorovaikutukset lujittavat neste–nestevuorovaikutuksia, mikä lisää nestemäisten rakenteiden järjestäytymistä. Lisääntyneiden neste–nestevuorovaikutusten muodostuminen siis edistää etanoli–vesiseosten poikkeavia termodynaamisia ominaisuuksia.⁸²

Pienet hydrofobiset ryhmät ovat suhteellisen vahvojen vesiryhmien ympäröiminä, mikä eliminoi hydrofobiset vuorovaikutukset. Hydrofobisen luonteensa mukaisesti alkoholit pyrkivät liuoksen pintaan muodostaen maksimissaan lähes yhden molekyylin vahvuisen kerroksen alentaen nesteen pintajännitystä.⁸³

Kun etanolin ja veden moolisuhde on suurempi kuin 0,1, tapahtuu selvää mikroaggregaatiota.⁸³ Laimeissa etanoli-vesiliuoksissa hydrofobinen hydraatio aiheuttaa alkoholin kertymisen nesteen pintaan. Kun yhden molekyylin kokoinen kerros on muodostunut, liuoksen molekyylit, joko pinnassa tai muualla liuoksessa, alkavat muodostaa ryhmiä. Vähitellen veden vetysidosverkosto tuhoutuu kasvavien kertymien vuoksi. Sen seurauksena pinnan etanolylimäärä vähenee, kun molekyylin väliset vuorovaikutukset heikentyvät.

Puhtaassa etanolissa toisiinsa liittyneet etanolimolekyylit koostuvat alle neljästä molekyylistä.⁸⁴ Etanolin 10-tilavuusprosenttinen liuos muodostaa etanoliryhmittymiä dimeereistä oktameereihin. Suuremmat kuin yhdeksän etanolimolekyylin ryhmät ovat pääasiassa liittyneet vesimolekyyleihin. On arveltu, että kahdeksan ja vähemmän molekyyliä sisältävät etanoliryhmät toimivat runkoina suuremmille binäärisille etanoli-vesiryhmille. Vesimolekyylien läsnäolo edistää etanoliryhmien syntymistä. Etanoliryhmiä syntyy alhaisessa etanolikonsentraatioissa.⁸⁵ Suurilla etanolikonsentraatioilla, jolloin etanolin mooliosuus on 0,7–0,9, simulaatiot osoittavat vesiryhmien esiintymisen. Etanoli häiritsee vesivetysidosten rakennetta.

Kuvassa 21 on esitetty mahdollisia vesi-alkoholiseosten rakenteita alkoholien mooliosuuksia vasten.



Kuva 21. Alkoholi-vesiseokset on jaettu kolmeen alueeseen (A, B, C) vesi- tai etanoliryhmittymisten perusteella.⁸⁶ Jokainen seosalue on kuvattu alkoholin mooliosuutta, X_{alc} vasten. Myös jokaisen alueen mahdollinen rakenne on kuvattu. Etanoli-vesiseoksissa alue C alkaa jo etanolin mooliosuudella 0,168. Kerrosrakennetta voi esiintyä mooliosuuden 0,1 molemmin puolin. A = Luontaisen vesiryhmän rakenne, B = Kerrosrakenne, C = Alkoholin ryhmittymisrakenne.

4.2 Muita liuottimia

Puun uuteaineita on liuotettu etanolin lisäksi tolueenilla, bentseenillä, dikloorimetaanilla, metanolilla, vedellä ja asetonilla.⁸⁷ Jos näytteen pH-arvo on alle 3 ennen asetoniuuttoa, uutteen määrä on hieman suurempi uutun jälkeen.

Poolittomana sykloheksaani liuottaa ainoastaan lipofiilisiä uuteaineita, joita ovat rasvahapot, hartsihapot, rasva-alkoholit, sterolit, di- ja triglyseridit, steryyliesterit ja vahat.⁸⁸ Lipofiilisiä yhdisteitä sisältävä aines voidaan uutata liuosseoksella sykloheksaani: asetoni suhteessa 9:1. Päinvastoin kuin asetoni, sykloheksaani-asetoniseos ei liuota merkittävässä määrin fenolisia yhdisteitä kuten lignaaneja. Asetoni on korvannut uuttoliuotinstandardina karsinogeenisen dikloorimetaanin. Koska asetoni ei liuota niin tarkasti lipofiilisiä yhdisteitä, B. Holmbomin mukaan uuteaineiden määrä ei tällöin ole kovin informatiivinen.⁸⁹

TAPPIIn (Technical Association of Pulp and Paper Industry) ohjeessa T 204 cm-07 annetaan menetelmät kolmeen erilaiseen liuotinsysteemiin.⁹⁰ Ohjeen mukaan dikloorimetaani antaa pienemmän saannon kuin ohjeen kaksi muuta liuotinta, asetoni tai etanoli-bentseeniliuos. Uutto liuksella, joka sisältää 1/3 etanolia ja 2/3 bentseeniä, antaa suurimman saannon uuteaineita, mikä on seurauksena hiilihydraateista ja polyfenoleista, joilla on alhainen molekyylipaino. Huomattakoon, että bentseeni on karsinogeeninen liuos.

Taulukko 9. Eräiden uuteaineiden liuottimien vertailua⁸⁹

Liuotin	Hartsihapot, monoterpenoidit, muut terpenoidit	Rasvat, rasvahapot, steryyliesterit, sterolit	Fenolit	Glykosidit, sokerit, tärkkelys, proteiinit	Epäorgaaniset aineet
Alkaanit	XXX	XXX	0	0	0
Dietyylietteri, dikloorimetaani	XXX	XXX	XX	0	0
Asetoni	XXX	XXX	XXX	XX	X
Etanoli	XX	XX	XXX	X	X
Vesi	0	0	X	XXX	XX

XXX = Liukenee helposti; XX = Liukenee; X = Liukenee vähän; 0 = Ei liukene

Kuten taulukosta 9 voidaan todeta, asetoni on etanolia parempi yleisliuotin uuteaineille. Yhteenvetona voidaan todeta liuottimista se, että yhtä ainoaa kaiken kattavaa hyvää liuotinta eri yhdisteryhmille ei ole olemassa.

4.3 Kiinteän aineen uutto

Tässä uuttotavassa kiinteästä aineesta uutetaan sopivalla liuottimella haluttuja yhdisteitä, jotka jäävät liuottimeen.⁹¹ Tätä prosessia voidaan hyödyntää joko arvokkaan kiintoaineen liuottamiseen tai vapauttamaan käyttökelpoinen liukenematon yhdiste liukenevasta materiaalista.

Uuttamiseen käytettävä menetelmä riippuu liukenevan komponentin osuudesta, sen jakautumisesta kiinteään aineeseen, kiinteän aineen ominaisuuksista ja partikkelikoosta.⁹¹ Jos liennut aine on tasaisesti levinnyt kiinteän aineeseen, materiaali lähellä pintaa liukenee ensiksi jättäen huokoisen rakenteen kiintoaineeseen. Liuottimen on siten tunkeuduttava huokoisen rakenteen läpi saavuttaakseen liukenevan aineen, jolloin prosessi etenee hankalammin ja uuttonopeus hidastuu.

Mikäli liukenevan aineen pitoisuus kiintoaineesta on korkea, huokoinen materiaali voi hajota lähes välittömästi, eikä siten haittaa liuottimen pääsyä liukenevan aineen luokse.⁹¹ Yleisesti prosessi voidaan jakaa kolmeen osaan, joista ensimmäinen on faasimuutos, jossa liukeneva aine liukenee liuottimeen. Toisessa osassa liennut aine diffundoituu liuottimeen kiintoaineen huokosissa partikkelin ulkopuolella. Kolmannessa osassa liennut aine siirtyy partikkeleihin kosketuksissa olevasta luoksesta suureen määrään liuosta. Mikä tahansa näistä kolmesta vaiheesta voi rajoittaa uuttonopeutta, vaikkakin faasimuutos on niin nopea, ettei sillä ole vaikutusta.

Partikkelin koko vaikuttaa uuttonopeuteen monella tapaa.⁹¹ Mitä pienempi koko, sitä suurempi on faasien välinen pinta-ala nesteeseen ja kiinteään aineeseen välillä ja siksi materiaalin siirtonopeus on suurempi. Lisäksi liuotettavan yhdisteen diffuusiomatkaksi kiinteässä aineessä on pienempi. Toisaalta uutto ei ole niin tehokasta erityisesti hyvin hienojen materiaalien ollessa kyseessä, mikäli liuottimen kierto on estynyt ja partikkelien erotus nesteestä ja kiintoainejäännöksen poisto on vaikeata. Partikkelikokojen vaihtelualue tulisi olla pieni, jotta jokaisen partikkelin uuttoaika olisi lähes sama. Erityisesti pitäisi välttää tuottamasta suurta määrää pieniä partikkeleita, koska ne voivat tukkia suurempien partikkelien väliset raot ja siten estää liuottimen virtaamisen.

Liuottimen viskositeetti pitäisi olla riittävän matala, jotta se voi kiertyä vapaasti.⁹¹ Yleensä alussa liuotin on suhteellisen puhdasta, mutta uuton edetessä liunneen aineen konsentraatio nousee ja uuttonopeus vähitellen hidastuu. Aluksi sen vuoksi, että konsentraatiogradientti vähenee ja toisaalta liuos tulee koko ajan viskoottisemmaksi. Useimmissa tapauksissa uutettavan materiaalin liukoisuus kasvaa lämpötilan nousun mukana, jolloin uuttonopeus kasvaa.⁹¹

Lisäksi diffuusiokertoimen odotetaan kasvavan lämpötilan kanssa ja myös tämä parantaa uuttonopeutta. Joissakin tapauksissa lämpötilan yläraja määräytyy muiden seikkojen mukaan.

Uuttolämpötila tulisi valita liukenevuuden, liuotin-höyrypaineen, liunneen aineen diffuusiokyvyn, liuottimen selektiivisyyden, ja tuotteen herkkyyden parhaan tasapainon saavuttamiseksi.⁹² Liuoksen sekoittaminen on hyödyllistä, koska se lisää pyörrediffuusiota ja siten se lisää materiaalin siirtoa partikkelien pinnasta liuokseen.⁹¹ Sekoitus ehkäisee myös materiaalin laskeutumista astian pohjalle erityisesti pienen raekoon prosesseissa.

4.4 Massan siirto kiinteän aineen uuttoprosesseissa

Massasiirtonopeuksia on vaikeaa arvioida huokoisessa jäännöksessä, koska on mahdotonta määrittellä kanavien muotoa, joiden läpi siirtyminen tapahtuu.⁹¹ On mahdollista kuitenkin löytää likimääräinen siirtonopeus kiinteänä aineen partikkeleista suureen nestemäärään. Kun ohut kerros vastustaa massansiirtoa, massan siirron yhtälö voidaan ilmaista, kuten kaavassa 1⁹¹ on esitetty:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k' \cdot A \cdot (c_s - c)}{b} \quad (1)$$

A = kiinteän ja nesteen välisen rajapinnan ala,

b = kiinteitä partikkeleja ympäröivän nestemäisen kerroksen tehollinen paksuus,

c = liunneen aineen konsentraatio suuressa määrässä liuosta ajan hetkellä t,

c_s = kylläisen liuoksen konsentraatio liuoksen ollessa kosketuksissa partikkeleihin,

M = liunneen aineen massa, joka siirtyy ajassa t ja

k' = diffuusiokerroin.

Oletetaan, että kyseessä on panosprosessi, jossa V on liuoksen kokonaistilavuus, joka on vakio. Tällöin voidaan esittää kaava 2⁹¹:

$$dM = V * dc \quad (2)$$

dM = liuenneen aineen massan muutos,

V = tilavuus ja

dc = konsentraation muutos.

Kun edellä mainittu kaava 2 sijoitetaan kaavaan 1, saadaan kaava 3:⁹¹

$$\frac{dc}{dt} = \frac{k' * A * (c_s - c)}{b * V} \quad (3)$$

Aika t on se aika, joka kuluu liuoksen konsentraation nousemiseen lähtötilanteesta c_0 lopputilanteeseen c .⁹¹ Aika t saadaan integroimalla olettaen, että sekä b ja A pysyvät vakioina. Tämän lisäksi oletetaan käytettävän puhdasta liuotinta, jolloin alkuperäinen konsentraatio c_0 on nolla.

Päädytään seuraavaan yhtälöön 4:⁹¹

$$c = c_s * \left(1 - e^{-\left(\frac{k' * A}{b * V}\right) * t}\right) \quad (4)$$

Yhtälö 4 osoittaa liuoksen lähenevän kylläistä tilaa eksponentiaalisesti.⁹¹ Useimmissa tapauksissa kiinteän ja nesteen välisen rajapinnan ala pyrkii kasvamaan uuton aikana, ja kun liukeneva materiaali muodostaa erittäin suuren osuuden kokonaiskiintoainepitoisuudesta, täydellinen partikkelien irtautuminen toisistaan voi tapahtua. Vaikka tästä on seurauksena rajapinta-alan kasvu, uuttonopeus mahdollisesti hidastuu, koska liuottimen vapaa virtaus estyy ja termi b eli kiinteitä partikkeleja ympäröivän nestemäisen kerroksen tehollinen paksuus kasvaa.

4.5 Kiinteän aineen uuttolaitteistot

Normaalin kiinteän aineen uutto perustuu kiinteän ainesosan liukenemiseen, liuoksen erotukseen liukenemattomasta jäännöksestä ja kiinteän aineen pesuun.⁹¹ Pesun tarkoituksena voi olla joko tarpeettoman liukenevan aineksen poistaminen tai kaiken halutun aineksen talteen saaminen.

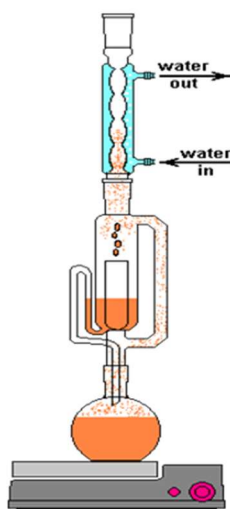
Panosprosessi on ollut tyypillinen kiinteän aineen uuttoprosessi, mutta myös jatkuvatoimisia laitoksia on kehitetty.⁹¹ Laitteisto on kytköksissä kiintoaineen luonteeseen; raomainen, solumainen, karkea tai hieno aines tarvitsee oman käsittelytapansa.

Uuton nopeus on yleensä nesteen ja kiintoaineen välisen suhteellisen nopeuden funktio.⁹¹ Joissakin prosesseissa kiintoaine on stationäärifaasi ja nesteet virtaavat partikkelikerroksen läpi, joissakin jatkuvatoimisissa laitoksissa neste ja kiintoaine liikkuvat vastavirtaan.

Lopullisen virtaaman koostumus ja määrä ovat kytkeytyneet uuttolaitoksen tuotantokapasiteettiin.⁹² Liuotteen poisto ja uutevirtaaman konsentraatio ovat ne tekijät, jotka parantavat prosessin taloudellista hyötyä.

4.5.1 Soxhlet -uutto

Saksalainen kemisti Franz Von Soxhlet antoi nimensä vuonna 1879 kehittämälleen uuttolaitteistolle.⁹³ Uuttoperiaate voidaan havaita kuvasta 22. Soxhlet-uuttolaitteen muodostaa ylhäältä alaspäin kuvattuna pallojäähdytin, laitteen Soxhlet -osa, keittopullo ja lämmityslaite. Uuttolaitteen Soxhlet-osa on paikka, jossa varsinainen uutto tapahtuu. Siinä on tila selluloosasta tehdyille uuttohylsulle, johon uutettava kiinteä aine sijoitetaan. Keittopullossa kiehuva liuotin höyrystyy, höyry nousee ylöspäin isompaa höyryputkea pitkin ja kohtaa pallojäähdyttäjän, joka jäähdyttää liuottimen takaisin nesteeksi. Neste pisaroi kohti uuttohylsyssä olevaa kiinteää ainetta ja kertyy uuttohylsyyn, kunnes nesteen pinta saavuttaa sifonin yläosan tason. Tällöin neste tyhjenee uuttohylsytilasta lapon avulla ja uuttokierto alkaa alusta.

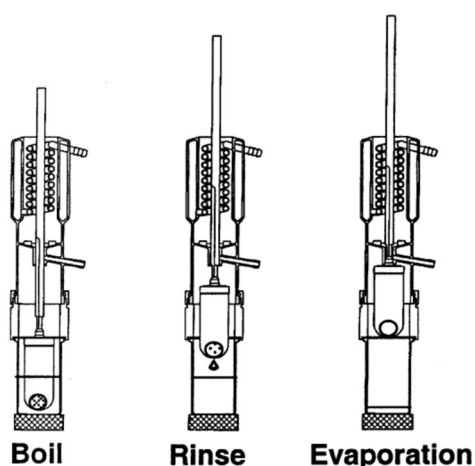


Kuva 22. Soxhlet-uuttolaitteisto.⁹⁴

Uutto saattaa kestää useita tunteja. Kun uutto lopetetaan, laite puretaan, ja Soxhlet-osasta valutetaan jäljelle jäänyt uuttoliuos keittopulloon, jossa liuos voidaan haihduttaa ja jäljelle jäänyt kiintoaine analysoidaan. Soxhlet-uuttolaite on varmatoiminen, kunhan liuottimen määrän riittävyys on kiinnitetty huomiota. Uuton pitkä kesto voi olla rajoite. Soxhlet-osan käsittely vaatii kokemusta ja saattaa olla myös virhelähde, mikäli uuttoliuosta ei saada kerättyä tarkoin talteen.

4.5.2 Soxtec -uutto

Soxtec-uutto on Soxhlet-uutosta kehitetympi versio, jonka Edward Randall loi 1970-luvulla.⁹³ Randallin menetelmässä tutkittava kiinteä näyte uuttohylsyssä upotetaan kokonaan liuottimeen (kuva 23). Liuottimen annetaan kiehua haluttu aika. Höyry nousee kohti jäädyttäjää, ja lauhtunut neste palautuu jatkuvasti näytteen läpi liuotinosaan. Tämä vaihe ratkaisevasti kiihdyttää uuttoa verrattuna Soxhlet-menetelmään, sillä liuotin yksinkertaisesti liuottaa kiinteän aineen nopeammin kuumassa liuottimessa. Tällöin uuttoon kulunut aika pienenee. Edellytyksenä on, että kiehuvan nesteen pinta tulee olla ylempänä kuin uuttohylsyssä oleva näyte. Lopuksi uuttoliuos haihdutetaan ja uutettu aine on valmis analysoitavaksi. Soxtec -metodi on noin 20–25 prosenttia nopeampi kuin Soxhlet-menetelmä.



Kuva 23. Soxtec-uuton periaate.⁹³

Kun kiehumisvaihe on ohi, nostetaan näyte pois liuottimesta ja jätetään kiehuvan liuottimen yläpuolelle.⁹³ Jäljelle jäänyt uutettava aine huuhdellaan liuotinastiaan. Tämä vaihe on yleensä 10–20 minuuttia pidempi kuin kiehumisvaihe.

Viimeisenä vaiheena on haihdutus tai liuottimen talteenotto.⁹³ Tällöin lauhtunut liuotin jatkaa kiehumista ja haihtuu. Liuotin johdetaan pois lauhtuttimesta avaamalla sisäinen venttiili. Haihdutusvaihe kestää 7–10 minuuttia riippuen liuottimesta. Liiallinen uutteen kuivaus voi johtaa uutteen hapettumiseen.

Joissakin Soxtec-uuttolaitemalleissa on mahdollisuus varastoida talteenotettu liuotin uudelleenkäyttöä varten.⁹³ Joissakin malleissa saattaa olla neljäs vaihe, jossa uutettua ainetta sisältävä liuoskoppi nostetaan muutama millimetri lämpölevyn yläpuolelle, jolloin säteilylämpö poistaa lopun kosteuden uutteesta. Tämä vaihe hyödyttää erityisesti lämmölle herkkiä aineita. Soxtec-uuttolaitetta on pyritty automatisoimaan.

4.5.3 Nopeutettu liuotinuutto

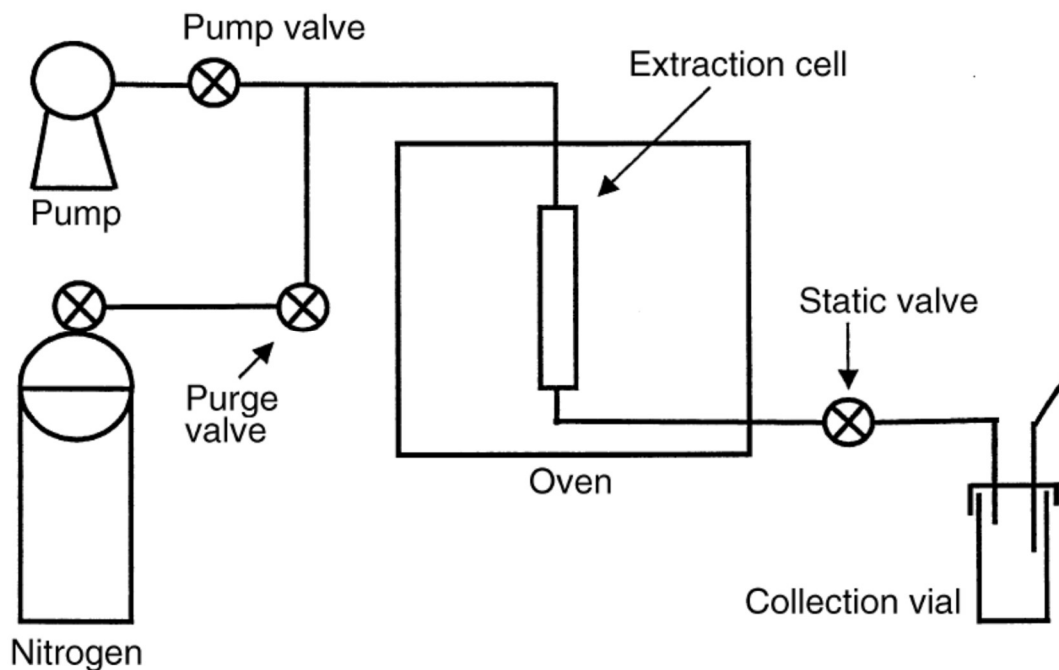
Nopeutettu liuotinuutto (Accelerated solvent extraction, ASE) on kiinteä-nesteuuttomenetelmä, joka suoritetaan korkeassa lämpötilassa ja paineessa.⁹⁵ Lämpötila voi olla yleensä 50–200 °C ja paine 10–15 MPa. ASE-uutto on siis eräs paineistetun uuton menetelmä. Korkea lämpötila kiihdyttää uuttokinetiikkaa ja korkea paine pitää liuottimen nestemäisessä muodossa. Tällöin saavutetaan nopea uutto. Korkea paine myös mahdollistaa uuttokammion täyttymisen nopeammin ja auttaa pakottamaan nesteen kiinteään ainekseen. Vaikka ASE-uutossa käytetty liuotin on yleensä orgaaninen, myöskään paineistettu kuuma vesi ei ole poissuljettu vaihtoehto.

Verrattuna tavanomaiseen Soxhlet-uuttoon ASE-uutto mahdollistaa uuttamisen pienemmällä liuotinmäärällä ja lyhyemmällä uuttoaajalla.⁹⁵ Lisäksi tätä menetelmää pidetään turvallisempänä.⁹⁶ Lämpötilaan tulee kiinnittää huomiota, jos uutettavan aineen joukossa on lämmölle herkkiä ainesosia.⁹⁵

Esimerkiksi vettä, metanolia, asetonia tai heksaania käytetään tavanomaisesti 75–150 °C lämpötilassa.⁹⁷ Liuottimet pyritään pitämään nestemäisessä tilassa, ja tavanomainen paine tällöin on 10,4 MPa.

Jablonský *et al.*⁹⁸ tutkivat ASE-uuton avulla kuusen kuorta.⁹⁸ Koeasettelussa verrattiin Soxhlet-uuttoa ASE-uuttoon, joka suoritettiin 80, 120 ja 160 celsiusasteessa ja 10,4 MPa paineessa. Suurin saanto oli ASE-uutossa 160 celsiusasteessa, 13,8 prosenttia. ASE-uutto 120 °C ja Soxhlet-uutto vastasivat toisiaan saannon puolesta, mikä oli runsas 10 prosenttia. ASE-uutto 80 celsiusasteessa antoi saannoksi 7,5 prosenttia. Huomattakoon, että kokonaisuuuttoaika oli ASE-uutoissa reilu alle 40 minuuttia kun taas Soxhlet-uutto kesti 540 minuuttia. Lisäksi 160 celsiusasteen ASE-uutossa saatiin uutettua jonkin verran enemmän yhdisteitä.

ASE-uuton kaavio on esitetty kuvassa 24.⁹⁷ Uuttomenetelmä sisältää yhdistelmän liuottimen dynaamista ja staattista virtausta kuumennetun näytteen sisältävän uuttokammion läpi. Näiden kammioiden tulee läpäistä korkean paineen edellyttämät turvallisuusvaatimukset. Yleensä ne ovat rakennettu ruostumattomasta teräksestä. Kammion koko vaihtelee 1-100 mL. Liuottimen tulee täyttää näytekammio, jotta taataan hyvä kontakti liuottimen ja näytteen kanssa. Samalla vältetään mahdollinen analyytin hapettuminen, joka voi olla mahdollista ilman vaikutuksesta korkeissa lämpötiloissa. Näytekammio kuumennetaan suorassa kontaktissa lämmönlähteeseen. Mikäli näytekammiota lämmitetään ennen liuottimen lisäämistä, voi tämä vähentää haihtuvien aineiden saantoa. Jotta saataisiin pidettyä uuttoliuotin nestemäisenä, on käytettävä painetta tuottavaa lähdeä. Systemin paine täytyy olla suurempi kuin liuottimen paine, jotta liuotin pysyy nestemäisessä muodossa asetetussa lämpötilassa. Lisäksi liuottimen tulee kyetä liikkumaan näytekammion läpi kohtuullisessa ajassa. Tämä saadaan aikaan HPLC-tyyppisellä pumpulla, joka ylläpitää nesteen vakiopainetta 6.9–20.7 MPa. Kun lämpötapaino on saavutettu, näytekammio pidetään asetuslämpötilassa vielä 5–10 minuutin ajan. Tämän jakson aikana analyytit otaksutusti diffundoituvat matriisista liuottimeen. Tämän staattisen vaiheen jälkeen avataan näytteenottokammion ulostulossa venttiili, ja mitattu tilavuus tuoretta liuotinta, yleensä 40–60 prosenttia näytekammion tilavuudesta, huuhtoutuu näytteen yli, jolloin näytekammiossa aikaisemmin ollut liuotin päätyy keruuastiaan tai -pulloon. Lopuksi tyypikaasun avulla pakotetaan putkista ja näytekammiosta loput liuottimesta keruuastiaan.



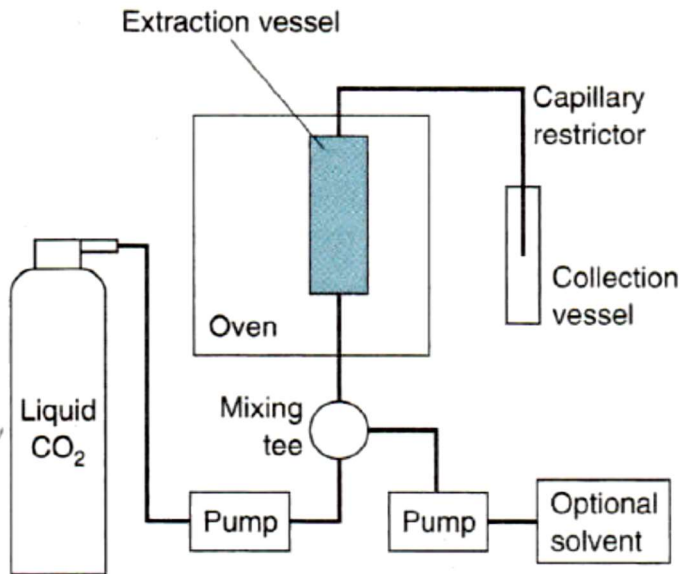
Kuva 24. ASE-uuton toimintaperiaate.⁹⁷

4.5.4 Ylikriittinen uutto

Ylikriittinen uutto (Supercritical fluid extraction, SFE) käyttää ylikriittistä nestettä uuttoluottimena.^{99a} Ylikriittinen nesteen lämpötila ja paine ovat kriittisen pisteen yläpuolella, jolloin vain yksi faasi esiintyy. Hyvin yleisesti käytetty uuttoneste on edullinen CO₂. Tämän fluidin kriittinen piste on 31,3 °C ja 73,9 bar sekä tiheys on tässä pisteessä 0,448 g/mL. Hiilidioksidin lisäksi voidaan käyttää polaarista liuotinta, esimerkiksi metanolia, jolloin myös polaaristen analyyttejä voidaan uuttaa.

Arshadi *et al.*¹⁰⁰ tutkivat SFE:n männyn sahanpurun soveltuvuutta rasva- ja hartsihappojen uuttamiseen.¹⁰⁰ Liuottimena toimi ylikriittinen hiilidioksidi ja polaarisena liuottimena etanoli. Koejärjestelyn tarkoituksena oli uuteaineiden saannon maksimointi. Kokeessa olosuhteet olivat 74–250 bar ja 40–60 °C. Korkeampi paine ja matalampi lämpötila antoi suuremman saannon eli 97 prosentin rasva- ja hartsihappojen saanto (2 tunnin uutolla 250 bar, 40 °C, 40 g/min ja 10-prosenttinen etanoli lisäliuottimena).

SFE:n uuttoperiaate voidaan nähdä kuvasta 25.^{99b} Paineistettu fluidi pumpataan kuumennetun uuttoastian läpi. Fluidi voidaan jättää kontaktiin näytteen kanssa joksikin aikaa, tai se voidaan pumpata uuttoastian läpi jatkuvatoimisesti. Uuttoastian ulostulossa neste virtaa kapillaariputken läpi, jolloin paine alenee. Poistuva hiilidioksidi haihtuu ja uute jää keruuastiaan. Vaihtoehtoisesti hiilidioksidia voidaan kuplittaa keruuastian liuottimen läpi.



Kuva 25. SFE-uuton periaate.^{99b}

5 Analytiikka

1950-luvulla G. C. Harris kehitti menestyksekkäimmän menetelmän hartsihappojen analysointiin.³⁰ Tässä menetelmässä on kolme tekniikkaa, joista ensimmäisessä saostetaan lähes puhtaat hartsihappojakeet amiinisuolalla. Toisessa tekniikassa UV-spektroskopian avulla määritetään jakeiden koostumus. Viimeiseksi liitetään maleiinianhydridi Diels-Alder-additioreaktiolla levopimaarihappoon.

Nykyään luotetaan enimmäkseen laitetekniikkaan, eli kaasu- ja nestekromatografiset analyysitekniikat massaspektrometriaa unohtamatta ovat pääasiallisia tutkimusmenetelmiä. Uuteaineita tutkitaan uutteista aluksi gravimetrisesti tai muulla vastaavalla tavalla uuteaineiden kokonaismäärän selvittämiseksi.⁸⁹ Tämän lisäksi voidaan määrittää erilaiset komponenttiryhmät. Lopuksi pyritään analysoimaan yhdisteet. Seuraavissa luvuissa kartoitetaan joitakin mahdollisia laiteteknisiä tutkimusmenetelmiä.

5.1 Kaasukromatografia

5.1.1 Kaasukromatografi–liekki-ionisaatiodetektor

Hartsihappojen tutkimiseen GC- FID on käytetyin. Esikäsittelyyn kuuluu näytteen saattaminen nestemäiseen muotoon. Jotta saataisiin haihtumattomasta yhdisteestä haihtuva, derivatisoidaan näyte muun muassa silyloimalla. Kaasukromatografia käytetään yhdisteiden kvantitointiin, mikä saattaa vaatia useamman sisäisen standardin. Tutkittavia aineita ovat esimerkiksi rasvahapot, hartsihapot, lignaanit, sterolit, steryyliesterit ja triglyseridit.

Uuteaineryhmien analysoinnissa on käytetty lyhyttä kolonnia, jonka mitat voivat olla 5–7 metriä, ohut filmi 0,15 mikrometriä ja sisähalkaisija 0,53 millimetriä.¹⁰¹ Pitkän kolonnin mitat ovat esimerkiksi 25 metriä tai enemmän, filmi 0,25 mikrometriä ja sisähalkaisija 0,25 millimetriä. Kolonnien stationäärifaaseina on käytetty joko poolitonta 100 prosenttista dimetyylipolysiloksaania tai heikosti polaarista seosta sisältäen 95 prosenttia dimetyylipolysiloksaania ja 5 prosenttia difenyylipolysiloksaania.¹⁰² Poolittoman stationäärifaasin ja näytteen vuorovaikutukset pohjautuvat dispersioon, kun taas heikosti polaarisen ja näytteen välillä on dispersioon lisäksi fenyyliryhmissä esiintyvät dipoli-dipolivuorovaikutukset.^{103a}

Näyte injektoidaan uunissa olevaan kolonniin, jonne kantajakaasu, joka toimii liikkuvana faasina, kuljettaa höyrystyneen näytteen. Uunin lämpötilaohjelman avulla saadaan erottumaan toisistaan. Kolonnista yhdisteet siirtyvät detektorille, ja detektorin antama tieto käsitellään tietokoneella sopivaan muotoon.

Detektorina käytetty FID ilmaisee kaikki sähköisesti varautuneet hiukkaset.¹⁰⁴ Kantokaasu ja vety sekoittuvat ennen FID:ia. Myös ilmaa lisätään detektoriin, ja sen tarkoitus on toimia hapettimena. Liekin sähkönjohtavuus muuttuu ainemäärän suhteen lineaarisesti. Orgaaniset molekyylit siis hajoavat palaessaan happea sisältävässä vetyliekissä ja muodostavat hajoamistuotteita, jotka detektori havaitsee elektrometrin mittaaman virran muutoksena.^{103b} FID on herkkä, ja se tunnistaa lähes kaikki orgaaniset yhdisteet. Yhdisteitä, jotka eivät reagoi vety-ilma liekissä, ovat muun muassa CO₂, CO, NO₂, O₂, HCOOH ja H₂O.

5.1.2 Kaasukromatografi–massaspektrometri

GC on suhteellisen vaivaton liittää detektorina käytettävään massaspektrometriin (MS).^{105a} Tällöin käytetään kolonneja, joiden sisähalkaisija on 0,2–0,32 millimetriä, mikä vaikuttaa virtausnopeuteen. Virtausnopeus vaihtelee 0,5–2 mL/min välillä, mikä puolestaan on sopiva massaspektrometrin vakuumpumpuille. Nykyaikaiset vakuumpumput tosin mahdollistavat myös suurten tilavuuksien injektoinnin. GC:n kolonni liitetään suoraan MS:n ionisaatiokammioon. Yleisimmät ionisaatiometodit GC-MS-yhdistelmälle on elektroni-ionisaatio (EI) ja kemiallinen ionisaatio (CI). EI:ssa käytetään yleisemmin 70 eV:n energiaa, johon kaupalliset spektrikirjastot perustuvat.

GC-MS:n avulla yhdisteet identifioidaan spektrikirjastojen avulla. Näytteen esikäsittely on lähes identtinen kuten GC:ssa. Yleisin menetelmä hartsihappojen analysointiin on GC-FID- ja GC-MS-detektorilla varustettuna sekä näytteiden derivatisointi silyloinnin avulla.

5.1.3 Pyrolyysi–kaasukromatografi–massaspektrometri

Pyrolyysi-GC-MS on semikvantitatiivinen analyysi.¹⁰⁶ Sillä voidaan analysoida muun muassa ligniinejä, hiilihydraatteja, tanniineja ja uuteaineita. Py-GC-MS:lla voidaan analysoida pieniä noin 1 mg näytteitä. Tulokset annetaan pyrogrammeina.

Py-GC-MS:n toimintaperiaatteena on aluksi pyrolysoida näyte hapettomissa olosuhteissa inertissä kaasussa 500–1000 °C lämpötilassa.¹⁰⁷ Näyte voi olla kiinteässä tai nestemäisessä tilassa. Tietyissä olosuhteissa näyte hajoaa luonteenomaisesti hajoamistuotteikseen. Pyrolyysituotteet analysoidaan GC:lla, jonka detektorina on MS. Tulokset voidaan tulkita saaduista massaspektreistä käyttäen massaspektirikirjastoja.

Suurin osa lämmön aiheuttamasta molekyylien hajoamisista on tuloksena vapaiden radikaalireaktioiden aloittamasta sidosten katkeamisista ja riippuu sidosten suhteellisista lujuuksista, jotka pitävät molekyyliä yhdessä.¹⁰⁷ Suuri molekyyli hajoaa ja järjestyy uudelleen luonteenomaisesti.

Pyrolyysissä monet orgaaniset yhdisteet tuottavat niukasti haihtuvia polaarisia molekyyliä, jotka eivät erotu GC:ssa tehokkaasti.¹⁰⁸ Tällaisia yhdisteitä ovat muun muassa rasvahapot sekä di- ja triterpenoidihapot, jotka muodostuvat pyrolyysissä lipideistä ja pihkoista. Yleisin tapa ratkaista tämä ongelma on käyttää derivatisoivaa reagenssia, joka vähentää pyrolyysituotteiden polaarisia ominaisuuksia sekä parantaa analyysin suorittamista ja detektointirajoja. Silyointireagenssi HMDS:lla on saatu hyviä analyysituloksia diterpenoidien suhteen.

5.2 Nestekromatografia

5.2.1 Ohutlevykromatografia

Ohutlevykromatografiaa (TLC) on käytetty lignaanien tutkimiseen jo useiden vuosikymmenten ajan.⁵³ Käytetyin TLC stationäärifaasi on ollut silikageeli. Silikageelilevyt erottelevat hyvin pihkan komponentit, muun muassa hiilivedyt, steryyliesterit, diterpeenialdehydit, triglyseridit, rasva- ja hartsihapot, erilaiset terpeenialkoholit ja steroliyhdisteet. Tarkempi analyysi yksittäisille pihkan yhdisteille voidaan saada erottamalla preparatiivisesti komponenttiryhvät, jotka analysoidaan esimerkiksi joko GC:lla tai HPLC:lla. Myös kvantitatiivinen analyysi on mahdollista, mikäli sopivat ryhmäkohtaiset sisäiset standardit lisätään näytteeseen.⁸⁹ Rasva- ja hartsihapot voidaan erottaa toisistaan silikageelilevyillä käyttäen eluointiliuosta, jossa on dikloorimetaania, metanolia ja ammoniakkia suhteessa 80:19:1.

Puiden lignaanitutkimuksissa Willför *et al.*⁵³ havaitsivat TLC:n soveliaana uutteen nopeaan seulomiseen ja alustavaan lignaanien erotteluun jatkotutkimuksia varten GC:lla ja HPLC:lla. Esimerkiksi TLC:ssa käytettiin käänteisfaasilevyjä (RP-levyjä) joiden silikageelinä toimi RP-8 pieninä määrinä pihdassa, männnyssä ja kuudessa esiintyvien lignaanien alustavaan eristykseen. Myös lignaaneja, joilla on sama lukumäärä hydroksyyli-ryhmiä, voidaan myös erotella. Kaikki lignaanit absorboivat UV-valoa ja niitä voidaan tarkastella 254 nm aallonpituudella.

Myös viisi-prosenttista rikkihappo–etanoliinliuosta voidaan ruiskuttaa TLC-levyyn.⁵³ Lignaanien tunnistusta voidaan helpottaa värjäämällä, jolloin ruiskutetaan etanolin ja rikkihapon seosta levyihin ja lämmitetään levyt nopeasti uunissa. Kaksidimensionaalinen TLC voi ratkaisevasti parantaa tiettyjen lignaanien erotusta. TLC antaa hyvän yleiskuvan lignaaneista, vaikkakaan kaikkia lignaaneja ei voi erottaa.

5.2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Kersten *et al.*¹⁰⁹ kehittivät pika-analyysin havupuiden abietaanien analysointiin nestekromatografille. Analyysimenetelmä sopii abietiini-, paluistriini-, levopimaari-, neoabietiini- ja dehydrobietiinihapoille. Konjugoidun kaksoissidoksen vuoksi abietaanit muodostavat tyypillisen UV -spektrin. Tutkimuksessa käytettiin HPLC:ia ja C-18-käänteisfaasikolonnia. Detektorina toimi UV -detektori, diodirividetektori (DAD), jolla on laaja aallonpituusalue.

Menetelmässä valmistettiin varastoliuos standardihartsihapoista 95 prosenttiseen etanoliin, jonka hartsihappopitoisuutena oli noin 2 mg/mL.¹⁰⁹ Näyteseoksen konsentraatio oli 1 mM. Mobiilifaasi oli isokraattinen ja koostui seoksesta, jossa oli 85 prosenttia metanolia, 5 prosenttia etikkahappoa ja 10 prosenttia vettä. Tutkimuksessa käytettiin neljää eri aallonpituutta eli 240 nm, 268 nm, 282 nm ja 300 nm.

Moniaallonpituusanalyysissa kyettiin osoittamaan, etteivät yhdisteet häiritse toisiaan, ja ne pystyttiin erottelemaan toisistaan eri aallonpituusalueiden ja retentioaikojen perusteella.¹⁰⁹ Myös kvantitatiivinen analyysi on mahdollista. Tässä menetelmässä näytteiden derivatisointia ei tarvita. Uutto-olosuhteet ja kromatografiset olosuhteet sopivat näytteille, joten tutkittavat yhdisteet säilyvät muuttumattomina. Kaikki yhdisteet ovat HPLC:n mobiilifaasissa haihtuvia, ja siksi yhdisteiden talteenotto fraktioidusta näytteestä on yksinkertaisempaa.

Käytettäessä massaspektrometriä nestekromatografian detektorina saadaan herkkä ja tarkka analyysilaitteisto.^{105b} Jotta saadaan ylimääräisiä liuotinmolekyyliä poistettua ja analyysi ionisoitua kaasufaasiin, käytetään erityistä liitosmetodia. Tällä hetkellä ovat käytetyimmät menetelmät sähkösumutus-ionisaatio (ESI), kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa (APCI) ja fotoionisaatio ilmanpaineessa (APPI).

Sellu- ja paperiteollisuuden prosessivesien analysointiin on käytetty muun muassa LC-ESI-MS:iin ja LC-APCI-MS:iin perustuvia tutkimusmenetelmiä.¹¹⁰ Näiden yhdisteiden eristämiseksi on tärkeää kiinnittää huomiota veden pH:n säätöön. pH-arvoja 2–12 on käytetty. Kolonneina on ollut C8 tai C18 käänteisfaasikolonnejä. Näytteet on voitu uuttaa ennen analyysiä tai injektoida suoraan analyysilaitteeseen. Liikkuvana faasina on käytetty muun muassa asetonitriilin ja ammoniumasetatin seosta sekä metanolin, veden ja asetonitriilin seosta.

HPLC:ia yhdessä MS:n kanssa on käytetty lignaanianalyysiin 1990-luvun puolivälistä alkaen.⁵³ Enimmäkseen analyysit suoritetaan negatiivisessa moodissa, sillä useimmissa lignaaneissa esiintyvät happamat fenoliryhmät luovuttavat helposti protonin. HPLC-kvadrupoli MS ei mahdollista kemiallisen rakenteen täydellistä määrittämistä, joten se sopii lähinnä jo tunnettujen aineiden kvantitointiin. Edellytyksenä on, että näytteestä on saatavilla puhdas referenssinäyte. LC-ioniloukun kanssa massaspektrometrin, lähinnä tandemmasspektrometrin, (MS/MS) mahdollisuudet tuntemattomien yhdisteiden tunnistamiseen paranevat.

LC-ESI-MS/MS: ia on käytetty hydroksimatairesinolin emäksisistä liuoksista muodostuneiden tuotteiden rakenteiden päättelyyn. Myös HPLC-APCI-MS/MS:ia on käytetty lignaanien ja lignaaniglukosidien määrittämiseen.

LC-MS/MS on Willför *et al.*⁵³ mukaan erinomainen analyysilaitte tuntemattomien yhdisteiden määrittämiseen.⁵³ HPLC-MS/MS on myös hyvä menetelmä tunnettujen lignaanien kvantitoimiseen, mutta se tarvitsee puhtaita deuteroituja yhdisteitä. LC-MS/MS on herkkä ja selektiivinen ja polyfenoleille sopiva analyysimenetelmä erityisesti biologisissa matriiseissa.¹⁰¹

GC-FID, GC-MS ja TLC ovat edelleen tärkeitä analysointitekniikoita.¹⁰¹

6 Yhteenveto

Kuusen erittämä pihka on yhdistelmä erilaisia sekundäärisiä metaboliitteja, jotka kuusi luo entsyymaattisesti. Pihka voidaan jakaa fysiologiseen pihkaan, patologiseen pihkaan ja kalluspihkaan.

Pihkassa esiintyy mono-, seskvi-, di- ja triterpeeneitä ja -terpenoideja. Suurin ryhmä esiintyvistä yhdisteistä ovat diterpenoidit eli hartsihapot. Etanoliin uuttuu myös lignaaneja, lignaaniestereitä ja hydroksikanelihappoja.

Etanoli ei ole välttämättä paras uuttoliuos verrattuna esimerkiksi asetoniin. Uutossa tulee ottaa huomioon myös raekoko, lämpötila ja sekoitus. Uuttoliuoksen viskositeetilla ja polaarisuudella on merkitystä. Mitä korkeampi etanolin lämpötila on, sitä pienempi viskositeetti on. Etanoli-vesiseoksissa etanolin mooliosuuksilla 0,2-0,4 on suurin viskositeetti. Uuttoliuoksena käytetty etanoli ei helposti muodosta estereitä hartsihappojen kanssa steeristen esteiden vuoksi. Etanoliuutto ei kata kaikkia mahdollisia uuteaineyhdisteitä mitä kuudesta olisi hyödynnettävistä. Yhtä ainoaa hyvää liuotinta pihkan eri yhdisteryhmille ei ole olemassa.

Lääkkeen ja myrkytön ero on annostuksessa, kuten Paracelsus ammoin totesi. Niin on myös paperi- ja selluteollisuuden prosessivesissä esiintyvien hartsihappojen suhteen. Pihkan hartsihapot lignaani- ja fenoliyhdisteinen ovat tehokas antimikrobinen lääke, mutta prosessivesissä ne ovat myrkyllinen lisä. Toivottavasti teollisuuden prosesseja kyetään kehittämään uuteaineiden hyödyntämiseksi.

7 Kirjallisuusviiteluettelo

1. Metsälä, H., *Pihka*, Sarmala Oy/ Rakennusalan Kustantajat RAK, Jyväskylä, 2001, ss. 62–63.
2. Piippo, S., *Luonnon lääkeyrtit 2*, Tammi, Hämeenlinna, 2004, ss. 211–212.
3. Tarinamme. Erilainen yritys 2000, <https://www.repolar.com/fi/our-story>, Repolar Pharmaceuticals (27.1.2017).
4. Havupuista antibiootteja – lääketutkimus voitti Slushin kilpailusta 100 000 euron pääpalkinnon, <http://yle.fi/uutiset/3-9328845> (1.12.2016).
5. *Picea abies* - Metsäkuusi, kuusi,
http://www.helsinki.fi/metsatieteet/arboretum/puulajit/picea_abies.html
(27.1.2017).
6. Kuusi *Picea abies*, <http://www.luontoportti.com/suomi/fi/puut/kuusi> (27.1.2017).
7. Langenheim, J., *Plant Resins, Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany*, Timber Press, Hong Kong, 2003, ss. 24–35.
8. Hiltunen, R. ja Holm, Y., *Farmakognosia, farmaseuttinen biologia*, Gaudeamus, Helsinki, 2000, ss. 185–254.
9. Holmbom, T., Reunanen, M. ja Fardim, P., Composition of callus resin of Norway spruce, Scots pine, European larch and Douglas fir, *Holzforschung*, **2008**, 62, 417–422.
10. Sjöström, E., *Puukemia teoreettiset perusteet ja sovellukset*, 4. painos, Otakustantamo, Helsinki, 1989, ss. 88–96.
11. Jääskeläinen, A. ja Sundqvist, H., *Puun rakenne ja kemia*, Otatieto Oy, Helsinki, 2007, ss. 96-111.
12. Keeling, C. I., Weisshaar, S., Ralph, S. G., Jancsik, S., Hamberger, B., Dullat, H. K. ja Bohlmann, J., Transcriptome mining, functional characterization, and phylogeny of a large terpene synthase gene in spruce (*Picea* spp.), *BMC Plant Biology*, **2011**, 1–14.
13. Pazouki, L. ja Niinemets, Ü., Multi-substrate terpene synthases: their occurrence and physiological significance, *Frontiers in Plant science*, **2016**; 7,1-16.
14. Gutiérrez, A., del Río, J. C., Martínez, M. J. ja Martínez, A. T., The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing, *Trends in Biotechnology*, **2001**, 19, 340–348.

15. Alén, R., Structure and chemical composition of biomass feedstocks. Kirjassa: Alén, R., (toim.), *Biorefining of Forest Resources*, Bookwell Oy, Porvoo, 2011, s. 48.
16. Terävä, E. ja Kanervo, E., *Kasvianatomia*, Edita Publishing Oy, Helsinki, 2008. s. 98.
17. Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J. ja Bohlmann, J., Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems, *Plant Physiology*, **2002**, *129*, 1003-1018.
18. Lindmark-Henriksson, M., Isaksson, D., Vaněk, T., Valterová, I., Högberg, H. ja Sjödin, K., Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture, *Journal of Biotechnology*, **2004**, *107*, 173–184.
19. Keeling, C. ja Bohlmann, J., Diterpene resin acids in conifers, *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 2415–2423.
20. Xu, R., Fazio, G. C. ja Matsuda, S. P. T., On the origins of triterpenoid skeletal diversity, *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 261–291.
21. Breitmaier, E., *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, John Wiley & Sons, Germany, 2006, ss. 105–107.
22. Le Milbeau, C., Lavrieux, M., Jacob, J., Bréheret, J., Zocatelli, R. ja Disnar, J., Methoxy-serratenes in a soil under conifers and their potential use as biomarkers of Pinaceae, *Organic Geochemistry*, **2013**, *55*, 45–54.
23. Vikström, F., Holmbom, B. ja Hamunen, A., Sterols and triterpenyl alcohols in common pulpwoods and black liquor soaps, *Holz als Roh- und Werkstoff*, **2005**, *63*, 303–308.
24. Holmbom, B., Extraction and utilisation of non-structural wood and bark components. Kirjassa: Alén, R., (toim.), *Biorefining of Forest Resources*, Bookwell Oy, Porvoo, 2011, s. 178.
25. Piispanen, R., Willför, S., Saranpää, P. ja Holmbom, B., Variation of lignans in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) knotwood: within-stem variation and the effect of fertilisation at two experimental sites in Finland, *Trees*, **2008**, *22*, 317–328.
26. Jyske, T., Laakso, T., Latva-Mäenpää, H., Tapanila, T. ja Saranpää, P., Yield of stilbene glucosides from the bark of young and old Norway spruce stems, *Biomass and bioenergy*, **2014**, *71*, 216–227.
27. Kemppainen, K., Siika-aho, M., Pattathil, S., Giovando, S. ja Kruus, K., Spruce bark as an industrial source of condensed tannins and non-cellulosic sugars, *Industrial Crops and Products*, **2014**, *52*, 158–168.

28. Slimestad, R., Francis, G. W. ja Andersen, Ø. M., Directed search for plant constituents: a case study concerning flavonoids in Norway spruce, *Euphytica*, **1999**, *105*, 119–123.
29. Enoki, A., Isomerization and autoxidation of resin acids, *Wood research: bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University*, **1976**, *59/60*, 49–57.
30. Mutton, D.B., Wood resins. Kirjassa: Hillis, W. E. (toim.), *Wood Extractives and Their Significance to the Pulp and Paper Industries*, Academic Press Inc., Lontoo, 1962, ss. 345–347.
31. Rao, X., Synthesis and application of rosin-based surfactants. Kirjassa: Zhang, J., (toim.), *Rosin-based Chemicals and Polymers*, Smithers Rapra Technology Ltd., 2012, s. 131.
32. San Feliciano, A., Gordaliza, M., Salinero, M. A. ja Miguel del Corral, J. M., Abietane acids: sources, biological activities and therapeutic uses, *Planta Medica*, **1993**, *59*, 485–490.
33. Alén, R., *Kokoelma orgaanisia yhdisteitä. Ominaisuudet ja käyttökohteet*, Consalen Consulting, Jyväskylä, 2009, ss. 402–404.
34. Helfenstein, A., Vahermo, M., Nawrot, D. A., Demirci, F., İşcan, G., Krogerus, S., Yli-Kauhaluoma, J., Moreira, V. M. ja Tammela, P., Antibacterial profiling of abietane-type diterpenoids, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2017**, *25*, 132–137.
35. Vasilevsky, S. F., Baranov, D. S., Govdi, A. I., Sorokina, I. V., Tolstikov, T. G., Tolstikov, G. A. ja Alabugin, I. V., Click chemistry on diterpenes: anti-inflammatory activity of the acetylenic derivatives of levopimaric acid and products of their transformations, *ARKIVOC*, **2014**, *2014*, 145–157.
36. Simonsen, J. ja Barton, D. H. R., *The terpenes. Sesquiterpenes, diterpenes and their derivatives, vol. III*, University Press, Cambridge, 1961. ss. 428–436.
37. Kusumoto, N., Zhao, T., Swedjemark, G., Ashitani, T., Takahashi, K. ja Borg-Karlson, A.-K., Antifungal properties of terpenoids in *Picea abies* against *Heterobasidion parviporum*, *Forest pathology*, **2014**, *44*, 353–361.
38. González, M. A., Pérez-Guaita, D., Correa-Royero, J., Zapata, B., Agudelo, L., Mesa-Arango, A. ja Betancur-Galvis, L., Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, *45*, 811–816.

39. Hirsilä, M., *Männyn (Pinus sylvestris) ja kuusen (Picea abies) kaupallisesti hyödynnettävissä olevat pienimolekyyliset yhdisteet*, Pro gradu-tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, Jyväskylä, 2005.
40. Lide, D. (toim.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 85. painos, CRC Press LLC, USA, 2004.
41. Smith, E., Williamson, E., Zloh, M. ja Gibbons S., Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*, *Phytotherapy Research*, **2005**, *19*, 538–542.
42. Scifinder.cas.org
43. Osete-Cortina, L. ja Doménech-Carbó, M. T., Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry with on line trimethylsilylation, *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1065*, 265–278.
44. Seppälä, M., (toim.), Klemetti, U., Kortelainen, V.-A., Lyytikäinen, J., Siitonen, H. ja Sironen, R., *Kemiallinen metsäteollisuus I paperimassan valmistus*, Opetushallitus, Saarijärvi, 2005, s. 82.
45. Valto, P., Knuutinen, J. ja Alén, R., Overview of analytical procedures for fatty and resin acids in the papermaking process, *Bioresources*, **2012**, *7*, 6041–6076.
46. Martin, V. J. J. ja Mohn, W. W., Genetic investigation of the catabolic pathway for degradation of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9, *Journal of Bacteriology*, **2000**, *182*, 3784–3793.
47. Liss, S. N., Bicho, P. A. ja Saddler, J. N., Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview, *Canadian Journal of Microbiology*, **1997**, *43*, 599–611.
48. Turnbull P. C. B., *Bacillus*, Chapter 15. Kirjassa: Baron, S., (toim.), *Medical Microbiology*, 4. painos, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699> (16.9.2017)
49. Kivisaari, H., *Sähkökoagulaatio hartsihappoja ja kuparia sisältävien jätevesien puhdistusmenetelmänä*, Pro gradu –tutkielma, Jyväskylän yliopisto, bio- ja ympäristötieteiden laitos, Jyväskylä, 2009.
50. Kertyvyys,
[http://www.kemikaalineuvonta.fi/fi/Saadosalue/CLP/Luokitus/Vaarallisuus-vesiymparistolle/Aineiden-luokitus/ Reach-, CLP- ja biosidineuvonta](http://www.kemikaalineuvonta.fi/fi/Saadosalue/CLP/Luokitus/Vaarallisuus-vesiymparistolle/Aineiden-luokitus/Reach-,CLP-ja-biosidineuvonta) (18.9.2017)

51. Suzuki, S., Stereochemical diversity in lignan biosynthesis and establishment of norlignan biosynthetic pathway, *Wood research: bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University*, **2002**, *89*, 52–60.
52. Finefield, J. M., Sherman, D. H., Kreitman, M. ja Williams, R. M., Enantiomeric natural products: occurrence and biogenesis, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **2012** *51*, 4802–4836.
53. Willför, S. M., Smeds, A. I. ja Holmbom, B. R., Chromatographic analysis of lignans, *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1122*, 64–77.
54. Teponno, R. B., Kusari, S. ja Spiteller, M., Recent advances in research on lignans and neolignans, *Natural Products Reports*, **2016**, *33*, 1044–1092.
55. Milder, I. E. J., Arts, I. C. W., Venema, D. P., Lasaroms, J. J. P., Wähälä, K. ja Hollman, P. C. H., Optimization of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, *52*, 4643–4651.
56. Ferrer, J.-L., Austin, M. B., Stewart, C., Jr. ja Noel, J.P., Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids, *Plant Physiology and Biochemistry*, **2008**, *46*, 356–370.
57. Raffaelli, B., *Synthesis of Lignano-9,9'-Lactones and Rearrangement Studies*, väitöskirja, Helsingin yliopisto, matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta, kemian laitos, Helsinki, 2012.
58. Ayres, D. C. ja Loike, J. D., *Lignans Chemical, Biological and Clinical Properties*, Cambridge University Press, USA, 2008, s. 148.
59. Sugahara, T., Yamauchi, S., Kondo, A., Ohno, F., Tominaga, S., Nakashima, Y., Kishida, T., Akiyama, K. ja Maruyama, M., First stereoselective synthesis of meso-secoisolariciresinol and comparison of its biological activity with (+) and (-)-secoisolariciresinol, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2007**, *71*, 2962–2968.
60. Hyvärinen, H., (toim.), *Kasvipäriset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit*, kirjallisuuskatsaus, Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, 2001. www.mtt.fi/asarja/pdf/asarja100.pdf (17.4.2014)
61. Walshe-Roussel, B., *An Ethnobiological Investigation of Q'eqchi' Maya and Cree of Eeyou Istchee Immunomodulatory Therapies*, Doctoral thesis, Department of Biology, Faculty of Science, University of Ottawa, 2014.

62. Herrmann, K. ja Nagel, C., Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1989**, 28, 315–347.
63. Trnková, L., Boušová, I., Kubíček, V. ja Dršata, J., Binding of naturally occurring hydroxycinnamic acids to bovine serum albumin, *Natural science*, **2010**, 2, 563–570.
64. Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N. ja Schmid, J., Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity, *Plant Physiology*, **1997**, 113, 175–179.
65. Kiliç, I. ja Yeşiloğlu, Y., Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2013**, 115, 719–724.
66. Katase, T., Stereoisomerization of p-coumaric and ferulic acids during their incubation in peat soil extract solution by exposure to fluorescent light, *Soil Science and Plant Nutrition*, **1981**, 27, 421–427.
67. Kort, R., Vonk, H., Xu, X., Hoff, W. D., Crielaard, W. ja Hellingwerf, K., Evidence for *trans-cis* isomerization of the p-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein, *FEBS Letters*, **1996**, 382, 73–78.
68. Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M., Harun, M. R., Omar, R. ja Siajam, S. I., Subcritical water technology for extraction of phenolic compounds from *Chlorella sp.* microalgae and assessment on its antioxidant activity, *Molecules*, **2017**, 22, 1–14.
69. Salonen, H., Suomalaiset pihkasta tehdyt hoitotuotteet valloittavat maailmaa, *Iltalehti*, 22.3.2017. http://www.iltalehti.fi/terveys/201703212200088877_tr.shtml (22.3.2017)
70. Mansikkamäki, E. ja Fali, P., Miljoonabisnestä jänkhältä–Lapin luonnon antimista kehitetyissä terveys- ja kauneustuotteissa yhdistyvät perinteet ja huipputeknologia, *Maaseudun tulevaisuuden kuukausiliite Kantri-lehti*, 2012, <http://www.suomenlehdisto.fi/wp-content/uploads/2013/04/KantriMiljoonabisnestprosenttiaC3prosenttiaA4.pdf> (12.2.2014).
71. OVA-ohje: Etanoli, Työterveyslaitos, <https://www.ttl.fi/ova/etanoli.html#ots1> (29.1.2014).
72. Altia tuotekansio, Teollisuusetanolit, yleistietoa etanolista, tuotetiedot, <http://rehu.altia.fi/connect/63425d20-a019-4753-8792-13ba75325548/altia+tuotekansio+13+org.pdf?MOD=AJPERES7/> (29.1.2014)

73. Polyvinyylialkoholin molekyyli­massan määrittäminen viskositeetista, <https://koppa.jyu.fi/avoimet/kemia/kems448/suomeksi/ohjeet/liuokset/viskositeetti> (10.3.2017)
74. Tanaka, Y., Yamamoto, T., Satomi, Y., Kubota, H. ja Makita, T., Specific volume and viscosity of ethanol-water mixtures under high pressure, *The Review of Physical Chemistry of Japan*, **1977**, *47*, 12-24.
75. Korpelainen, A., *Orgaaniset liuottimet kapillaarielektroforeesissa*, Pro gradu-tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos, Jyväskylä, 2007.
76. Clayden, J., Greeves, N. ja Warren, S., *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Kindle -painos, ss. 105–255.
77. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. ja Wothers, P., *Organic Chemistry*, Oxford University Press, China, 2009, s. 333.
78. Hoogenboom, R., Thijs, H. M. L., Wouters, D., Hoeppener, S. ja Schubert, U. S., Tuning solution polymer properties by binary water-ethanol solvent mixtures, *Soft Matter*, **2008**, *4*, 103–107.
79. Riekkola, M-L., Recent advances in nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2002**, *23*, 3865–3883.
80. Juurinen, I., Nakahara, K., Ando, N., Nishiumi, T., Seta, H., Yoshida, N., Morinaga, T., Itou, M., Ninomiya, T., Sakurai, Y., Salonen, E., Nordlund, K., Hämäläinen K. ja Hakala, M., Measurement of two solvation regimes in water–ethanol mixtures using X-ray Compton scattering, *Physical Review Letters*, **2011**, *107*, 197401-1–197401-5
81. Chaplin, M., Alcoholic solutions, http://www1.lsbu.ac.uk/water/aqueous_alcohol.html#soln, (29.5.2017)
82. Lam, R., Smith, J. ja Saykally, R., Hydrogen bonding interactions in water–alcohol mixtures from X-ray absorption spectroscopy, *The Journal of Chemical Physics*, **2016**, *144*, 191103-1–191103-4.
83. Yano, Y. F., Correlation between surface and bulk structures alcohol–water mixtures, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2005**, *284*, 255–259.
84. Wakisaka, A. ja Matsuura, K., Microheterogeneity of ethanol–water binary mixtures observed at the cluster level, *Journal of Molecular Liquids*, **2006**, *129*, 25–32.
85. Ghoufi, A., Artzner, F. ja Malfreyt, P., Physical properties and hydrogen-bonding network of water–ethanol mixtures from molecular dynamics simulations, *Journal of Physical Chemistry B*, **2016**, *120*, 793–802.

86. Wakisaka, A., Komatsu, S. ja Usui, Y., Solute-solvent and solvent-solvent interactions evaluated through clusters isolated from solutions: Preferential solvation in water-alcohol mixtures, *Journal of Molecular Liquids*, **2001**, *90*,175-184.
87. SCAN-CM 49:03 Wood chips for pulp production and pulp, Content of acetone-soluble matter, http://www.rise-pfi.no/wp-content/uploads/2017/03/CM_49-03.pdf (29.11.2017)
88. SCAN-CM 67:03 Wood chips for pulp production and pulp, Content of extractable lipophilic matter, http://www.rise-pfi.no/wp-content/uploads/2017/03/CM_67-03.pdf (29.11.2017)
89. Holmbom, B., Extractives. Kirjassa: Sjöström, E. ja Alén, R., (toim.), *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*, Springer-Verlag, Berliini, Heidelberg, Saksa, 1998, ss. 125–146.
90. Test Method T 204 cm-07, Solvent extractives of wood and pulp, <http://imisrise.tappi.org/TAPPI/Products/01/T/0104T204.aspx> (29.11.2017)
91. Coulson, J. M., Richardson, J. F., Backhurst, J. R. ja Harker, J. H., *Chemical Engineering volume two*, 3. painos, Exeter, Iso-Britannia, ss. 375–379.
92. Perry R.H. ja Green, D.W, *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7. painos, The McGraw-Hill Companies Inc., USA, 1997, s.18-58.
93. Luthria, D.L. ja Anderson, S., Soxtec: Its principles and applications, Chapter 2. Kirjassa: Luthria, D.L. (toim.), *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Competitive Studies*, AOCS Publishing, Champaign, Illinois, USA, 2004, ss.11–24. https://www.researchgate.net/publication/268292317_Soxtec_Its_Principles_and_Applications (18.10.2017)
94. Soxhlet mechanism.gif, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Soxhlet_mechanism.gif (16.10.2017)
95. Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants. https://www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/Pub_free/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants.pdf, United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008. (8.6.2015)

96. Mottaleb, M. A. ja Sarker, S. D., Accelerated solvent extraction for natural products isolation, Chapter 4. Kirjassa: Sarker S. D. ja Nahar L., (toim.), *Methods in Molecular Biology – Natural Products Isolation*, 3. painos, Humana Press, c/o Springer Science+Business Media, LLC, ss.75-87.
https://www.researchgate.net/publication/221864177_Accelerated_Solvent_Extraction_for_Natural_Products_Isolation (18.10.2017)
97. Luthria, D., Vinjamoori, D., Noel, K. ja Ezzell, J., Accelerated Solvent Extraction, Chapter 3. Kirjassa: Luthria, D.L. (toim.), *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Competitive Studies*, AOCS Publishing, Champaign, Illinois, USA, 2004, ss. 25–38.
98. Jablonský, M., Vernarecová, M., Ház, A., Dubinyová, L., Škulcová, A., Sladková, A. ja Šurina, I., Extraction of phenolic and lipophilic compounds from spruce (*Picea abies*) bark using accelerated solvent extraction by ethanol, *Wood Research*, **2015**, *60*, 583–590.
99. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*, 8. painos, W. H. Freeman and Company, USA, 2010. ss. a) 606, b) 711.
100. Arshadi, M., Hunt, A.J. ja Clark, J.H., SFE as an effective tool in reducing auto-oxidation of dried pine sawdust for power generation, *RSC Advances*, **2012**, *2*, 1806–1809.
101. Holmbom, B., Evolution of analytical techniques for extractives, *Biomassan jalostus ja analytiikka – haasteet ja tulevaisuuden näkymät*, Suomen Kromatografiaseuran, Åbo Akademin ja Nesteen Syysseminaari, Naantali 12–13.11.2015.
102. Understanding the Capillary GC Column: How to Choose the Correct Type and Dimension,
<https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/How%20to%20Select%20the%20Correct%20GC%20column%20March%202015.pdf>. Jones, S., Agilent, (10.4.2017).
103. Riekkola, M. ja Hyötyläinen, T., *Kolonnikromatografia ja kapillaarielektronimigraatiotekniikat*, Yliopistopaino, Helsinki, 2002. a) ss. 78–79, b) ss. 114–115.
104. Jaarinen, S. ja Niiranen, J., *Laboratorion analyysitekniikka*, 5-6. painos, Edita Prima Oy, Helsinki, 2008. s. 193.
105. Ketola, R., Kostiainen, R., Kotiaho, T. ja Vainiotalo, P., *Massaspektrometrian perusteet*, Hakapaino, Helsinki, 2010. a) ss. 163-164, b) s. 173.

106. Characterization of wood extractives,
<http://www.innventia.com/Documents/Produktblad/Biorefining/Characterization%20of%20wood%a20extractives%20120619.pdf?epslanguage=sv/> (17.11.2015)
107. Kusch P., Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Polymeric Materials, 2012, https://www.researchgate.net/publication/221929407_Pyrolysis-Gas_ChromatographyMass_Spectrometry_of_Polymeric_Materials (30.10.2017)
108. Lee M. S., *Mass Spectrometry Handbook*, John Wiley & Sons, USA, 2012, ss. 811-812.
109. Kersten, P. J., Kopper, B. J., Raffa, K. F. ja Illman, B. L., Rapid analysis of abietanes in conifers, *Journal of Chemical Ecology*, **2006**, 32, 2679–2685.
https://www.researchgate.net/publication/6713944_Rapid_Analysis_of_Abietanes_in_Conifers. (19.10.2015).
110. Rigol, A., Lacorte S. ja Barceló, D., Sample handling and analytical protocols for analysis of resin acids in process waters and effluents from pulp and paper mills, *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 738–749.