



Šolski center Celje

Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD EKSTRAKCIJE LUBJA BELE VRBE IN ANALIZA SESTAVE EKSTRAKTOV

Raziskovalna naloga

Avtorji: David Kovačič, 3. letnik

Peter Robič, 3. letnik

Miha Hotko, 3. letnik

Mentorica: Mojca Drofenik Čerček, univ. dipl. inž. kem. teh

Celje, 2015

ZAHVALA

Za uspešno izvedbo naše raziskovalne naloge so nam bile v pomoč naslednje osebe, ki se bi jim radi zahvalili:

Ge. Aleksandri Mlakar in ge. Sabini Litera za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela raziskovalne naloge.

G. Zvonku Črepinšku za nasvete pri izvedbi praktičnega dela.

Ge. Andreji Tkalec in ge. Klavdiji Špur Jereb za lektoriranje raziskovalne naloge.

Šolskemu Centru Celje za omogočanje izvedbe te raziskovalne naloge.

Sošolcu Tomiju Vavdiju za pomoč pri oblikovanju raziskovalne naloge.

Posebna zahvala gre naši odlični mentorici ge. Mojci Drofenik Čerček za vse nasvete, pomoč pri raziskovanju in izvajanju naše naloge.

KAZALO

1 UVOD	8
2 TEORETIČNE OSNOVE	9
2.1 Družina vrbovk <i>Salicaceae</i>	9
2.1.1 Vrbe.....	10
2.1.1.1 Vrbe v zgodovini	10
2.1.1.2 Vrbe danes.....	11
2.1.1.3 Salix alba ali bela vrba	11
2.1.1.3.1 Videz Salix alba ali bele vrbe.....	11
2.1.1.3.2 Razmnoževanje Salix alba ali bele vrbe.....	12
2.1.1.3.3 Učinkovine, ki jih vsebuje Salix alba ali bela vrba	12
2.1.1.3.4 Zdravilne lastnosti Salix alba ali bele vrbe	13
2.1.1.3.5 Uporaba Salix alba	13
2.2 Tanini.....	13
2.3 Glikozidi	14
2.4 Salicilati	17
2.5 Salicin.....	17
2.6 Uporaba in pridobivanje salicina v zgodovini	18
2.7 Ekstrakcija po Soxhletu	18
2.8 Maceracija	18
2.9 Ekstrakcijska topila.....	19
2.9.1 Aceton	19
2.9.2 Etanol	19
2.9.3 Metanol	20
2.10 Tankoplastna kromatografija	20
2.11 Uparjanje.....	21
2.11.1 Rotavapor.....	22
2.12 Centrifugiranje	22
2.13 Čiščenje s PVPP smolo	23
2.14 Čiščenje s smolo AMBERLITE XAD7HP.....	23
2.15 UV Spektrofotometrija.....	24
3 PRAKTIČNI DEL.....	26
3.1 Topnost salicina v različnih topilih	26
3.2 Shematski prikaz dela	27

3.3 Priprava vzorca	28
3.4 Ekstrakcija	30
3.4.1 Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom.....	30
3.4.2 Maceracija.....	31
3.4.2.1 Filtracija macerata	32
3.5 Uparjanje	32
3.6 Centrifugiranje taninov	34
3.7 Masa suhega vzorca ekstraktov	35
3.8 Čiščenje s smolo PVPP	38
3.9 Filtracija ekstraktov po čiščenju s smolo PVPP pod znižanim tlakom	39
3.10 Čiščenje s smolo AMBERLITE XAD7HP	40
3.11 Kromatografija	41
3.11.1 Izračun retenzijskih faktorjev.....	43
3.12 Uparjanje eluatov	44
3.13 Priprava raztopin za obarjanje	45
3.13.1 Priprava 10 % raztopine $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	45
3.13.2 Priprava 10 % raztopine Na_2HPO_4	46
3.14 Obarjanje	47
3.14.1 Obarjanje taninov s $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ in centrifugiranje le-teh.....	47
3.14.2 Obarjanje prebitka $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ z Na_2HPO_4 in centrifugiranje oborine	48
3.15 Sušenje ekstraktov	49
3.16 Tankoplastna kromatografija alikivotnega dela	50
3.17 Priprava raztopin za umeritveno krivuljo	53
3.18 Spektrofotometrično določanje salicina v ekstraktih	55
4 REZULTATI	57
5 RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK	58

KAZALO SLIK :

Slika 1: Strukturna formula salicina.....	8
Slika 2: Salix alba.....	12
Slika 3: Rotavapor.....	22
Slika 4: Laboratorijska centrifuga.....	22
Slika 5: Strukturna formula PVPP-ja.....	23
Slika 6: Formula AMBERLITE XAD7HP.....	23
Slika 7: Intenziteta monokromatske svetlobe pri prehodu skozi obarvano raztopino.....	24
Slika 8: Shematski prikaz dela.....	27
Slika 9: Mletje lubja v drobilniku.....	28
Slika 10: Ekstrakcija po Soxhletovi metodi s tremi različnimi topili. Od leve proti desni si sledijo: etanol, aceton, metanol.....	30
Slika 11: V jodirke zatehtamo vzorec za maceracijo. Od leve proti desni so etanol, metanol, aceton.....	31
Slika 12: Maceracija z mešanjem suspenzije lubja in izbranih topil. Od leve proti desni so metanol, etanol, aceton.....	32
Slika 13: Vzorci maceracije po uparjanju. Od leve proti desni si sledijo etanol mac., aceton mac., metanol mac.....	33
Slika 14: Ekstrakti po uparjanju. Od leve proti desni si sledijo aceton sox., aceton mac., metanol sox., metanol mac., etanol sox., etanol mac.....	33
Slika 15: Aceton sox. po centrifugiranju.....	34
Slika 16: Hlajenje vzorca.....	34
Slika 17: Etanol mac. po 16 h pri 4° C.....	35
Slika 18: Čiščenje s PVPP smolo.....	39
Slika 19: Nučiranje smole PVPP in nanje vezanih v vodi netopnih taninov v etanolu sox.	39
Slika 20: Eluacija AMBERLITE XAD7HP.....	41
Slika 21: Čistilna kolona AMBERLITE XAD7HP.....	41
Slika 22: Kromatogram ekstraktov pred čiščenjem in po njem. Od leve proti desni: aceton sox., aceton sox. po čiščenju, aceton mac., aceton mac. po čiščenju, etanol sox., etanol sox. po čiščenju, salicin, etanol mac., etanol mac. po čiščenju, metanol sox., metanol sox. po čiščenju, metanol mac., metanol mac. po čiščenju.....	43
Slika 23: Vzorci po uparjanju. Iz leve proti desni si sledijo aceton sox., etanol sox., metanol sox., aceton mac., etanol mac., metanol mac.....	44
Slika 24: Pripravljanje raztopine $Pb(C_2H_3O_2)_2$	46
Slika 25: Pripravljanje raztopine Na_2HPO_4	47
Slika 26: Oborjeni tanini.....	48
Slika 27: Etanol sox. po obarjanju prebitka svinčevega acetata z natrijevim hidrogen fosfatom.....	49
Slika 28: Vzorci v vodni kopeli.....	49
Slika 29: Pridobivanje vzorca s kromatogramske plošče in vzorec v centrifugirki z elucijsko tekočino.....	52
Slika 30: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije salicina.....	54
Slika 31: Graf odvisnosti masnega deleža salicina v vzorcih od ekstrakcijskega topila in ekstrakcijske metode.....	57

KAZALO TABEL

Tabela 1: Topoli in vrbe.	10
Tabela 2: Topnost salicina v uporabljenih topilih.	26
Tabela 3: Inventar uporabljen pri pripravi vzorca.	28
Tabela 4: Inventar uporabljen pri tehtanju vzorca.	29
Tabela 5: Mase vzorcev v tulcih.	29
Tabela 6: Mase vzorcev v jodirkah.	29
Tabela 7: Inventar uporabljen pri ekstrakciji s Soxhletovim aparatom.	30
Tabela 8: Pretoki pri ekstrakciji.	31
Tabela 9: Uporabljen inventar pri maceraciji.	31
Tabela 10: Uporabljen inventar pri filtraciji maceratov.	32
Tabela 11: Inventar, uporabljen pri uparjanju.	33
Tabela 12: Inventar, uporabljen pri centrifugiranju taninov.	34
Tabela 13: Mase izparilnic in vzorcev.	36
Tabela 14: Mase čaj z vzorci in brez njih.	37
Tabela 15: Uporabljen inventar pri čiščenju s smolo PVPP.	38
Tabela 16: Uporabljene kemikalije pri čiščenju s smolo PVPP.	39
Tabela 17: Inventar za čiščenje s PVPP smolo.	39
Tabela 18: Inventar, ki smo ga uporabili pri čiščenju s smolo AMBERLITE XAD7HP.	40
Tabela 19: Inventar kemikalij, uporabljen pri čiščenju s smolo AMBERLITE XAD7HP.	40
Tabela 20: Uporabljen inventar pri TLC.	41
Tabela 21: Uporabljene kemikalije pri TLC z izračunanimi volumni.	42
Tabela 22: Retenzijski faktorji.	44
Tabela 23: Uporabljen inventar pri pripravi $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	45
Tabela 24: Tabela kemikalij pri pripravi raztopine.	46
Tabela 25: Uporabljen inventar pri pripravi NaHPO_4	46
Tabela 26: Tabela kemikalij, uporabljenih pri pripravi raztopine.	47
Tabela 27: Uporabljen inventar pri obarjanju taninov.	47
Tabela 28: Uporabljene kemikalije pri obarjanju taninov.	48
Tabela 29: Uporabljen inventar pri obarjanju prebitka $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	48
Tabela 30: Uporabljene kemikalije pri obarjanju prebitka $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	49
Tabela 31: Inventar uporabljen pri TLC.	50
Tabela 32: Kemikalije, uporabljene pri TLC.	51
Tabela 33: Uporabljen inventar pri pripravi raztopin za umeritveno krivuljo.	53
Tabela 34: Absorbance pri umeritveni krivulji.	54
Tabela 35: Absorbance vzorcev z izračunanimi masami.	55
Tabela 36: Tabela rezultatov.	57

POVZETEK

Raziskovalna naloga opisuje različne metode ekstrakcije salicina iz lubja bele vrbe in analizo ekstraktov. Uporabili smo dve metodi ekstrakcije s tremi topili. Metodi sta navadna ekstrakcija oziroma maceracija in Soxhletova metoda, topila, ki smo jih uporabili, pa so bila 100 % metanol, 30 % vodna raztopina etanola in 80 % vodna raztopina acetona. Postopki, ki smo jih uporabili za izolacijo salicina iz ekstrakta, so bili uparjanje, centrifugiranje, čiščenje s PVPP smolo in AMBERLITE XAD7HP ter obarjanje taninov z vodnima raztopinama svinčevega acetata in natrijevega hidrogen fosfata(V). Za analizo produkta smo uporabili tankoplastno kromatografijo in spektrofotometrijo.

Ključne besede: salicin, metanol, etanol, aceton, lubje bele vrbe, maceracija, Soxhletova metoda, ekstrakcija.

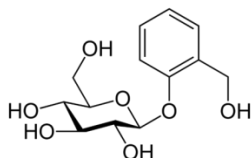
ABSTRACT

Research paper describes different methods of extraction of salicin from white willow bark and the analysis of the extracts. We used two methods of extraction and three solvents. The methods we used were normal extraction or maceration and the Soxhlet method and the solvents that we used were 100 % methanol, 30 % aqueous solution of ethanol and 80 % aqueous solution of acetone. The used procedures for the isolation of salicin from the extract were evaporation, centrifugation, cleaning with PVPP resin, AMBERLITE XAD7HP and the precipitation of tannins with an aqueous solution of lead acetate and disodium hydrogen phosphate. For the analysis of the product we used thin layer chromatography (TLC) and spectrophotometry.

Key words: salicin, methanol, ethanol, acetone, white willow bark, maceration, Soxhlets method, extraction.

1 UVOD

Salicin, [2-(hidroksimetil)fenil- β -glukopiranozid], je alkoholni glikozid, ki se pojavlja v vrstah rodov *Salix* in *Pouplus* (družina: *Salicaceae*). Učinkuje antirevmatično, antipiretično in analgetično. Uporablja se podobno kot aspirin v odmerkih od 0,3 do 1,0 g. Spoznanje teh lastnosti salicina pojasni veliko uporabo topolovega in vrbovega lubja v ljudskem zdravilstvu.



Slika 1: Strukturna formula salicina.¹

Namen te raziskovalne naloge je bil primerjati več metod ekstrakcije salicina iz lubja bele vrbe s tremi različnimi topili in sestavo ekstrakta po čiščenju. Najprej smo naredili ekstrakcijo lubja po Soxhletovi metodi in z navadno ekstrakcijo oziroma maceracijo. Pridobljeni ekstrakt smo nato uparili, da smo dobili višjo koncentracijo, nato pa smo ga centrifugirali. Čistili smo ga s PVPP smolo in AMBERLITE XAD7HP ter obarjali z raztopino svinčevega acetata in natrijevega hidrogen fosfata(V). Čistili smo z namenom, da bi izločili tanine, tako vodotopne, kot v vodi netopne. Po čiščenju smo izvajali analize s tankoplastno kromatografijo in spektrofotometrijo.

Hipotezi, ki smo jih postavili za to nalogo, sta naslednji:

1. Ekstrakcija po Soxhletovi metodi bo učinkovitejša.
2. Glede na topnost salicina v topilih, ki smo jih uporabili v nalogi, sklepamo, da bo največji izkoristek pri ekstrakciji z raztopino etanola.

¹ <http://sr.wikipedia.org/wiki/Salicin>

2 TEORETIČNE OSNOVE

V teoretičnih osnovah je predstavljeno nekaj o vrbah, salicinu, ekstrakcijskih topilih, metodah ekstrakcije in načinih čiščenja ter o analiznih metodah, ki so bile uporabljene pri raziskovalni nalogi.

2.1 Družina vrbovk *Salicaceae*

Družina vrbovk sestoji iz dveh rodov in sicer iz roda topolov (*Populus L.*) in roda vrb (*Salix L.*). V Sloveniji so avohtone naslednje vrste topolov:

- ❖ črni topol (*Populus negra L.*),
- ❖ beli topol (*Populus alba L.*),
- ❖ trepetlika (*Populus remula L.*),

in naslednje vrste vrb:

- ❖ bela vrba (*Salix alba L.*),
- ❖ alpska vrba (*Salix alpina L.*),
- ❖ rakita (*Salix aurita L.*),
- ❖ vrba žalujka (*Salix babylonica L.*),
- ❖ iva (*Salix caprea L.*),
- ❖ pepelnatosiva vrba (*Salix cinerea L.*),
- ❖ volčinasta vrba (*Salix daphnoides L.*),
- ❖ siva vrba (*Salix eleagnos L.*),
- ❖ krhlica ali krhka vrba (*Salix fragilis L.*),
- ❖ zelnata vrba (*Salix herbacea L.*),
- ❖ črnikasta vrba (*Salix myrsinifolia L.*),
- ❖ peteroprašniška vrba (*Salix pentandra L.*),
- ❖ rdeča vrba (*Salix purpurea L.*),
- ❖ mrežolistna vrba (*Salix reticulata L.*),
- ❖ topolistna vrba (*Salix retusa L.*),
- ❖ rožmarinolistna vrba (*Salix rosmarinifolia L.*),
- ❖ mandljeva vrba (*Salix triandra L.*),
- ❖ beka (*Salix viminalis L.*),

❖ Waldsteinova vrba (*Salix waldsteiniana* L.).

Znanstvena klasifikacija topolov in vrb je opisana v tabeli 1.

Tabela 1: Topoli in vrbe.

	Topoli	Vrbe
kraljestvo	Plantae (rastline)	Plantae (rastline)
deblo	Magnoliophyta (kritosemenke)	Magnoliophyta (kritosemenke)
razred	Magnoliopsida (dvokaličnice)	Magnoliopsida (dvokaličnice)
red	Malpighiales (rastline)	Malpighiales (rastline)
družina	Salicaceae (vrbovke)	Salicaceae (vrbovke)
rod	Populus L.	Salix L.
število vrst v Sloveniji	3 avtohtone	23 avtohtonih

Za pripadnike družine *Salicaceae* je značilno, da lahko rastejo v obliki grmov ali dreves ter da imajo enospolne cvetove v obliki klasov, t.i. mačice, ki so lahko obrnjeni navzgor ali navzdol. Vrbovke lahko zrastejo tudi nad 30 metrov v višino, kar je približno toliko kot 10-nadstropna stavba. V naravi vrbovke največkrat rastejo ob robovih gozdov, na močvirnatih travnikih ter ob površinskih vodah, kot so potoki, reke in jezera. Obstajajo pa izjeme, ki uspevajo tudi na gorskih tleh do približno 1800 metrov nadmorske višine.

2.1.1 Vrbe

2.1.1.1 Vrbe v zgodovini

Vrbe so že omenjene v Bibliji, v kateri je navedeno, da so Izraelci, ki so ta čas živeli kot pregnanci v Babilonu, obešali svoje harfe na vrbe (Psalm 137:2). Omenjene so tudi vrbine veje, iz katerih so izdelovali šotore (3. Mojzes 23:40, 9). V Bibliji piše tudi o neustrašnem podvodnem konju, ki živi v potokih in ga obdajo vrbe (Jakob 40:22).

2.1.1.2 Vrbe danes

Uporabnost vrb je raznolika. Pomembna je med drugim njihova tehnična uporabna vrednost, saj se iz lesa vrbovih mladih vej izdelujejo pleteni izdelki, kot so košare, koši, namizna dekoracija ali pohištvo. Vrbe so hitrorastoče rastline, to je ena najpomembnejših lastnosti te družine, saj je s tem omogočena njihova uporaba v papirni industriji in biomasi. Uporabljajo se tudi za utrjevanje brežin zaradi njihovega močnega koreninskega sistema. V Sloveniji je uporaba vrb v primerjavi z drugimi vrstami dreves majhna. Eden glavnih razlogov za to je, da v Sloveniji nimamo pravih rastišč, kjer bi rastline lahko uspevale, med tem, ko je v sosednji državi Hrvaški bolj razširjena, ker je tam več primernih rastišč za to vrsto drevja, zlasti ob reki Dravi in Savi, ki sta večinoma zasajeni z vrbami. Gospodarsko najpomembnejša vrsta v teh območjih je bela vrba, iz katere je uspelo žlahtniteljem vzgojiti vrsto klonov, in jih uporabljajo za zasajanje različnih nasadov. Lubje vrbovk se uporablja v zdravstvu.

2.1.1.3 *Salix alba* ali bela vrba

2.1.1.3.1 Videz *Salix alba* ali bele vrbe

Bela vrba je listopaden listavec, ki raste in uspeva po vsej Sloveniji, največkrat jo najdemo v nižinah ob rekah in potokih.

Salix alba ali bela vrba je znana tudi pod drugimi imeni, kot so srebrnolista vrba in maleka. Ime bela ali srebrnolista vrba je drevo dobilo po svojih značilnih ozkosuličastih listih dolžine 5 do 10 centimetrov, ki so na spodnji strani srebrnkasto-beli in pokriti z dlačicami na zgornji strani pa živo zeleni in ob robovih drobno narezani. Drevo lahko zraste od 20 do 25 metrov v višino, deblo pa do 60 cm v premeru. Krošnjo sestavljajo dve ali tri močnejše veje, iz katerih izraščajo tanjše veje, ki so za to drevo značilno obrnjene navzdol. Mladi poganjki so rumeno do rahlo rdečkasto obarvani ter izredno upogljivi. Drevo pokriva rumenkasto do sivo lubje, ki je po letih značilno vzdolžno in prečno razpokano, medtem ko je lubje na mlajših vejah gladko prožno ter svetleče rumene do sive barve. Cvetovi rastline so enospolni in rastejo na ločenih drevesih.

Moški cvetovi so 6 centimetrov dolge mačice rumenkaste barve, ki so med sabo združene. Prav tako so tudi ženski cvetovi združeni v podobne mačice, le da so zelene barve. Življenjska doba te rastline je manj kot 100 let, kar je precej kratko. Debla dreves tekom časa postajajo votla, saj njihov les hitro razpada.



Slika 2: Salix alba.

2.1.1.3.2 Razmnoževanje *Salix alba* ali bele vrbe

Rastlina je žužkocvetka, kar pomeni, da so za njeno opraševanje potrebne žuželke, kot so na primer čebele. Plodovi so rjave glavice, v katerih so bela puhasta semena, ki po zrelosti iz počene glavice izletijo zaradi svoje izredne lahкости. Semena so brez zalog hrane, ki bi omogočila začetno rast, zato je tudi njihova življenjska doba kratka. Odvisna so od vlažnih tal, ki omogočajo hitro kaljenje in takojšnjo rast rastlin. Mlade vrbe rastejo izredno hitro in sicer kar do 1 cm prirastka dnevno, med tem ko je celoten prirast rastline v prvih letih okoli dva metra in pol. Vse vrbe imajo rade vlažna in humusna tla, uspevajo pa lahko tudi na težkih suhih ali močvirnatih tleh, zato tudi niso občutljive na poplave. Za dobro rast potrebujejo zračna tla, ki naj bi bila nevtralnega ali pa rahlo kislega pH. Za rast potrebujejo sončno ali pa polsenčno lego, čisto senčna lega jim ne odgovarja. Drevo razvije globoko glavno korenino s številnimi manjšimi površinskimi koreninami; glavna korenina lahko doseže globino tudi do 4 metre in tako pride v stik s talno vodo. Razmnožuje se s semeni ali s potaknjenci.

2.1.1.3.3 Učinkovine, ki jih vsebuje *Salix alba* ali bela vrba

Skorja in listi bele vrbe vsebujejo veliko zdravilnih učinkovin, med njimi so, na primer:

- fenolni glikozidi,
- salicin,
- picein,
- estri salicilne kisline,
- kumarini,
- flavoni,
- tanini.

2.1.1.3.4 Zdravilne lastnosti *Salix alba* ali bele vrbe

Doma pripravljen čaj iz lubja bele vrbe ali pa kapsule, tinkture, poparki, prevretki, obkladki, mazila in kopeli imajo zelo veliko zdravilnih lastnosti. Čaj, kapsule, poparke in tinkture uporabljamo pri zniževanju povišane telesne temperature, blaženju bolečin zlasti pri artritisu in vnetjih, spodbujanju prebave, proti driski, proti okužbam črevesja, pri neredni menstruaciji in materničnih krčih ter ob gripi, saj se salicin, ki ga vsebujejo, v črevesju pretvori v salicilno kislino, ki učinkuje pri revmatičnih težavah. Mazila, ki imajo kot osnovo izvlečke bele vrbe, uporabljamo za lajšanje bolečin mišic in sklepov ter za celjenje površinskih ran, ker vsebujejo čreslovine, ki pomagajo pospeševati celjenje.

2.1.1.3.5 Uporaba *Salix alba*

Lubje vrb se v posušeni obliki uporablja v ljudskem zdravstvu, in sicer za pripravo čajev, tinktur, prevretkov, poparkov, obkladkov. Iz njenih vej izdelujemo tudi pletene izdelke zlasti košare ter vrtno in hišno pohištvo. Tudi farmacevtska industrija je prepoznala veliko uporabno vrednost lubja oziroma vej saj iz njih izdelujejo razne kapsule, praškaste ekstrakte, tinkture, kapljice in podobno, med tem ko kozmetična industrija izdeluje kreme in mazila za vlaženje kože ter kreme proti aknam.

2.2 Tanini

Tanini ali čreslovina so polifenolne spojine, ki se nahajajo v večini vrst rastlin. Nekatere vrste jih vsebujejo toliko, da jih iz njih pridobivamo. Tanini so grenkega okusa ter obarjajo ali zvižajo proteine. Ime tanin poimenuje večino polifenolnih spojin, ki vsebujejo hidroksilno funkcionalno skupino ali kakšne druge, s katerimi naredijo komplekse z makromolekulami ali proteini. Njihova molekulska masa je od 500 do več kot 2000 g/mol, lahko pa reagirajo z želatino, težkimi kovinami, železom, limonino vodo, kovinskimi solmi, močnimi oksidanti, cinkovim sulfatom in alkalnimi spojinami.

Največ taninov je v golosemenkah in kritosemenkah. Največje koncentracije taninov zasledimo v vakuolah in v površinskem vosku rastlin, nahajajo pa se tudi v listih, popkih, semenih, koreninah in v steblu. Ti se aktivirajo v primeru celičnih poškodb ali celične smrti. Tanini se nahajajo tudi v lesu iglavcev in pripomorejo k daljšemu življenju lesa.

Poznamo več vrst taninov, na primer:

- **hidrolizirajoči tanini**, ki so estri sladkorja in molekul fenolnih kislin. Reakcija hidrolize na sladkor in fenolne kisline, poteče s šibko bazo ali kislino.
- **proantocianidi** ali **kondenzirani tanini** so povezani z enojnimi vezmi in se težko cepijo. Ti tanini so topni v vodi. Sestavljeni so iz verige od 2 do 50 flavanoidov, kar pomeni, da spadajo med polimere.

Ko zaužijemo čaj, začutimo grenak in trpek okus v ustih; to je zaradi prisotnosti taninov, kot so katehini in flavonoidi. Primer rastline, ki vsebuje veliko taninov je čajevec.

Kondenzirani tanini se nahajajo v vinu. Ti se pridobijo iz različnih virov, zato se glede na vir razlikujejo tudi njihove lastnosti. Najbolj trpek okus ima rdeče vino zaradi prisotnih taninov iz lupin grozdnih jagod in pečk. Ti so prisotni zaradi njihove fermentacije z namenom pridobivanja barve iz lupine grozdnih jagod. Vino vsebuje hidrolizirajoče tanine in kondenzirane tanine. Pri staranju vina so tanini zelo pomembni, saj preprečujejo oksidacijo in so del glavnega sedimenta pri vinu. Pri uživanju vina imajo kondenzirani tanini pozitivne učinke na ožilje, ker zavirajo delovanje peptida, ki povzroča otrdelost arterij.

Hidrolizirajoče tanine vsebujejo granatna jabolka. Eden izmed najbolj pogostih je punicalagin, ki ima molekulsko maso več kot 1000 g/mol.

Včasih so tanini veljali za toksične in nehranljive, danes pa poznamo njihove koristne in nekoristne lastnosti, ki so odvisne od njihove strukture in odmerka. Tanini v prevelikem odmerku zavirajo absorpcijo mineralov, na primer železa in kalcija, pomanjkanje le-teh pa lahko povzroči razne zdravstvene probleme. Da bi preprečili zaviranje absorpcije mineralov je priporočeno piti čaj in kavo med obroki in ne pri njih. Tanine lahko uporabimo tudi v medicini, saj imajo protivnetni učinek, zdravijo opekline, zaustavijo krvavitev, preprečujejo nastanek vnetij, uporabljajo se tudi za izvlek raznih strupov. Lahko se uporabijo tudi za izdelavo črnila, če jim dodamo raztopino železovega sulfata. Tanini so pomembna sestavina za strojenje usnja.

2.3 Glikozidi

Glikozidi so spojine, ki pri hidrolizi tvorijo enega ali več sladkorjev. Izraz glikozid je splošen izraz za spojine, ki se nahajajo v naravi in so kemijsko vezane na sladkor. Tako je glikozid sestavljen iz dveh delov sladkorja in aglikona. Zaradi ciklične strukture sladkorja obstajata

dve izomeri glikozida, ki se imenujeta alfa in beta anomera. Najpogosteje se pojavljajo sladkorji glukoza, galaktoza in ramnoza, digitoksoza pa je poznana le v vrsti *Digitalis purpurea*. V kemiji z imenom glikozidi označujemo vse molekule, v katerih je sladkorna skupina vezana preko anomernega dušika na drugo skupino z O-glikozidno ali S-glikozidno vezjo. Zgornjo definicijo uporablja IUPAC, z njo pa se veliko znanstvenikov ne strinja, saj izključuje polisaharide, pri katerih ne gre za povezavo med sladkorjem in nesladkorno molekulo, temveč za povezavo med več sladkorji. Zato je sladkorna skupina raje poimenovana kot glikonska, nesladkorna pa aglikonska skupina. V glikonsko skupino štejemo monosaharide (ena sladkorna skupina) in oligosaharide (več sladkornih skupin). Glikozidi igrajo pomembno vlogo v živih organizmih. Veliko glikozidov, ki nastanejo kot produkti rastlin, se uporablja v medicini. Na skupine jih lahko delimo glede na vrsto glikozidne vezi ali pa glede na vezan glikon oz. aglikon. Za potrebe biokemije in farmacije je najprimernejša klasifikacija glede na vezan aglikon. Glikozide delimo na:

- antrakinon glikozide,
- preproste fenolne glikozide,
- alkoholne glikozide,
- tioglikozide,
- flavonoidne glikozide,
- steroidne oz. kardiotonične glikozide,
- saponine,
- kumarin glikozide,
- cianogene glikozide.

Salicin spada med alkoholne glikozide. Pridobivajo ga iz *Salix purpurea* in *Salix fragilis*. Encim, ki je odgovoren za hidrolizo salicina, je emulzin. Pri hidrolizi se salicin spremeni v salicil alkohol in glukozo. Salicil alkohol ima podobne lastnosti kot salicilna kislina in se v telesu oksidira vanjo. Poleg salicina se tudi v lubju družine Salicaceae najde populin ali benzilsalicin.

Nomenklatura in klasifikacija

1. Glede na strukturo ločimo:

- α -glikozid,
- β -glikozid.

2. Glede na kemijsko skupino, ki je vezana na aglikon, ločimo:
 - O-glikozid (OH skupina),
 - S-glikozid (SH skupina),
 - N-glikozid (NH skupina),
 - C-glikozid (C skupina).
3. Glede na vrsto enostavnega sladkorja v glikozidu, ločimo:
 - glukozid (glikon je glukoza) npr. salicin,
 - galakozid (glikon je galaktoza),
 - manozid (glikon je manozna),
 - arabinozid (glikon je arabinoza).
4. Glede na število monosaharidov v sladkornem delu, ločimo:
 - monozid (en monosaharid) npr. salicin,
 - biozid (dva monosaharida) npr. gentobiozid,
 - triozid (trije monosaharidi) npr. stropantotriozid.
5. Glede na fiziološko ali farmakološko aktivnost (terapevtska klasifikacija), ločimo:
 - odvajalni glikozidi,
 - kardiotonični glikozid.
6. Glede na korelacijo do matičnega naravnega glikozida, ločimo:
 - primarni glikozid npr. amigdalín, purpurea glikozid A,
 - sekundarni glikozid npr. prunazín, digitoksin.
7. Glede na rastlinsko družino.
8. Glede na kemijske lastnosti aglikona, ločimo:
 - alkoholni in fenolni glikozidi (aglikoni so alkoholi ali fenoli),
 - aldehydni glikozidi (aglikoni so aldehidi),
 - cianogeni glikozidi (aglikoni so nitrili ali derivati cianovodikove kisline),
 - antraceni ali antrakinoni glikozidi (aglikoni so derivati antracena),
 - steroidni glikozidi (aglikoni so steroidne narave, pridobljeni iz ciklopentanoperhidrofenatrena),
 - kumarin glikozidi (aglikoni so derivati benzo- α -pirona),
 - kromon glikozidi (aglikoni so derivati benzo- δ -pirona),
 - flavonoidalni glikozidi (aglikoni imajo 2-fenil kromonovo strukturo),
 - žveplo vsebujoči tioglikozidi (aglikoni vsebujejo žveplo),
 - alkaloidni glikozidi (aglikoni so alkaloidne narave).

Sladkorji v glikozidih:

1. monosaharid (glukoza v salicinu),
2. disaharid (gentiobioza v amigdalinu),
3. trisaharidi (strofantotrioza),
4. tetrasaharidi (purpurea glikozidi),
5. redki sladkorji (deoksi sladkorji),
6. sladkor, povezan v eni poziciji na aglikon, redko v dveh pozicijah kot senozidi.

2.4 Salicilati

Salicilati so snovi, ki se naravno pojavljajo v rastlinah (sadje in zelenjava) in jih varujejo pred raznimi obolenji ter insekti. Najbolj poznan salicilat je acetilsalicilna kislina ali aspirin. Salicilati imajo zelo široko uporabo v zdravstvu, uporabljajo pa se tudi v kozmetični industriji, v šamponih, zobnih pastah, kremah za sončenje in britje, parfumih itd. Nekateri ljudje so zelo občutljivi na salicilate in lahko razvijejo razne alergije. Značilni simptomi so vrtoglavica, sprememba v barvi kože, bolečine v trebuhu in potenje rok, nog in obraza.

Prva zdravila, ki jih je začel uporabljati človek, so bili prav salicilati. Prvi salicilat je bila aceilsalicilna kislina ali aspirin, kot jo je komercialno poimenovalo podjetje Bayer iz Nemčije leta 1899, ki ga je tudi odkrilo. Že pred tem pa so uporabljali sredstva, pridobljena iz vrbovega lubja za zniževanje vročine. Za raziskovanje tega področja so se najbolj zanimali Italijani, ki so prispevali veliko novih odkritij v obdobju pred aspirinom. Mnogo različnih znanstvenikov je uporabilo ekstrakte vrbovega lubja v zdravstvu, vendar jim je vsak posameznik nadel drugačno ime, med njimi je bil tudi Francesco Fontana, ki je uporabil ime salicina (salicin).

Poleg salicina in salicilne kisline pa poznamo še veliko drugih salicilatov, kot so salicilna kislina, salol, metil salicilat, salicilamid ter novejše, kot so sulfasalazin, olsalazin, benorilat, mefenamska kislina in diflunisal.

2.5 Salicin

Salicin pridobivajo iz lubja vrbe in se uporablja kot protivnetno sredstvo ali za proizvodnjo salicilne kisline. Bobrovina, ki se je uporabljala kot analgetik, protivnetno sredstvo in antipiretik, prav tako vsebuje sledi salicina. To je zaradi tega, ker imajo bobri v svoji prehrani

les bele vrbe, salicin pa se nato spremeni v salicilno kislino. Pri uživanju salicina lahko nastopi tudi slabost, bruhanje, vrtoglavica in težave pri dihanju. Salicin je v prevelikih odmerkih tudi strupen, ker poškoduje ledvice, povzroči krvavitve in prebavne motnje. Salicin je poznan alergen, saj je kar nekaj ljudi alergičnih ali občutljivih na salicilate. Poleg teh salicina ne smejo jemati ljudje z astmo, diabetesom, hemofilijo, otroci, mlajši od 16 let ter nosečnice in doječe matere.

2.6 Uporaba in pridobivanje salicina v zgodovini

Salicin so poznali že stari severnoameriški domorodci, ki so se naučili izdelave protibolečinskega sredstva iz brezovega lubja. Obstajajo zapiski na papirusu, ki pričajo o tem, da so stari Egipčani izdelovali salicilne pripravke iz mirte, ki prav tako vsebuje salicin. V četrtem stoletju pred našim štetjem je Hipokrat uporabljal vrbovo lubje za lajšanje bolečin pri porodu in zniževanje povišane telesne temperature.

2.7 Ekstrakcija po Soxhletu

Za ekstrakcijo trdnih snovi se uporablja Soxhletov aparat. Aparat sestavljajo bučka (ekstrahirka), nastavek (ekstraktor) in hladilnik. Ko topilo zavre, gredo hlapi po stranski cevki do hladilnika, kjer se kondenzirajo in kapljajo v tulec, ki je v ekstraktorju. V ekstraktorju se zbira vroče topilo, ki snov ekstrahira. Ko topilo doseže pregib, ga ta pretoči nazaj v bučko. Postopek se večkrat ponovi. Ekstrakcija lahko poteka tudi več ur. Ko je ekstrakcija končana, jo prekinemo, tako da umaknemo gorilnik, ko je ekstraktor skoraj poln topila.

2.8 Maceracija

Pri ekstrakciji trdno–tekoče preide ekstrakt v topilo. To vrsto ekstrakcije imenujemo tudi izluževanje ali maceracija. Ekstrakcija poteka v več stopnjah:

1. Snov, ki jo ekstrahiramo, pomešamo s topilom, nato pa pustimo, da so faze dalj časa v kontaktu.
2. Sledi mehansko ločevanje teh dveh faz. Faze lahko ločimo s centrifugiranjem ali s filtriranjem.

3. Po filtriranju ali centrifugiranju termično ločimo raztopino v ekstrakt in topilo. Termično ločevanje poteka s pomočjo uparjalnikov, v laboratoriju se uporablja rotavapor.

2.9 Ekstrakcijska topila

2.9.1 Aceton

Aceton (C_3H_6O) je najbolj preprost keton, je brezbarven in vnetljiv. Imenujemo ga tudi propanon ali propan-2-on. Aceton je pomembno topilo, saj se dobro meša z vodo. Uporablja se kot topilo v organski kemiji, za proizvodnjo MMA ali metilmetakrilata in bisfenola A. V vsakdanji uporabi se uporablja kot odstranjevalec laka za nohte in za redčenje barve.

Aceton ima nizko kronično in akutno toksičnost, če ga zaužijemo ali vdihnemo. Ne spada med kancerogene, mutagene ali nevrotoksične kemikalije. Pri sobni temperaturi in normalnem zračnem tlaku ima vrelišče pri $56^\circ C$. Gostota acetona je $0,791 \text{ g/cm}^3$.

2.9.2 Etanol

Etanol (C_2H_5OH) je glavni alkohol, ki ga najdemo v alkoholnih pijačah. Odstranjevanje etanola iz človeškega telesa preko oksidacije, s pomočjo encimov v jetrih je omejena, kar pomeni, da dolgoročna uporaba velikih količin lahko povzroči resno poškodbo jeter. Čisti etanol draži kožo in oči ter povzroča slabost in bruhanje.

Etanol je lahko vnetljiva tekočina. Njegova gostota je $0,789 \text{ g/cm}^3$. Vrelišče ima pri $78,37^\circ C$.

Del etanola je hidrofobičen, kar pomeni, da se ne meša z vodo. Etanol je ena izmed redkih snovi, ki jih lahko tanko črevo absorbira. Zaradi tega se ustavi prenašanje vsebine želodca v črevo, tako etanol zaustavi absorbcijo nutrientov. Etanol po absorbciji potuje do jeter, kjer se metabolizira.

Etanol, ki se ne predela v jetrih, potuje do srca. V srcu etanol zmanjša njegov utrip, zaradi česar se bo znižal tudi tlak. Etanol, ki pride do srca, potuje po krvi do pljuč, pri čemer lahko oseba izdiha sledi etanola. Etanol pa ima tudi nekaj dobrih učinkov: zviša koncentracijo lipoproteinov, ki prenašajo holesterol po krvi, kar pomeni, da zmanjša možnosti za krvni strdek torej zniža možnost srčnega infarkta.

Je zelo reaktivna, vnetljiva, brezbarvna tekočina z močnim vonjem. Gori z modrim plamenom brez dima. Barve plamena se v normalni svetlobi ne vidi. Etanol je zelo močno topilo, saj se

meša z vodo, mnogimi organskimi topili pa tudi z nekaterimi alifatskimi ogljikovodiki. Mešanica etanola z vodo ima manjši volumen, kot je seštevek posameznih volumnov. Zaradi vodikovih vezi je čisti etanol higroskopičen, kar pomeni, da veže na sebe vodo iz zraka. Ker je del etanola polaren, raztaplja veliko ionskih spojin. Drugi del, ki je nepolaren, pa raztaplja nepolarne snovi, kot so na primer eterična olja. Če vodi dodamo nekaj odstotkov etanola, zelo znižamo njeno površinsko napetost.

2.9.3 Metanol

Metanol ima molekulsko formulo CH_3OH in se pridobiva s katalitsko reakcijo iz ogljikovega dioksida, ogljikovega monoksida in vodika. Metanol je zelo reaktivna, vnetljiva tekočina, ki ima podoben vonj kot etanol; to je najpreprostejši alkohol. Metanol je zelo toksičen, zato ni primeren za pitje. Uporablja se kot sredstvo proti zmrzovanju, pri denaturaciji etanola in pri proizvodnji biodizla. Metanol se v majhnih količinah nahaja tudi v zraku, saj se po nekaj dneh oksidira s pomočjo sončne svetlobe v vodo in ogljikov dioksid.

Metanol ima pri 25°C in tlaku 101,3 kPa gostoto $0,78664\text{ g/cm}^3$. Je lahko vnetljiv, strupen in ima posebne vplive na zdravje. 100 % metanol ima vrelišče pri $64,7^\circ\text{C}$ in je pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju.

Majhna količina zaužitega metanola se pretvori v formaldehid, ki je nevaren za centralni živčni sistem in lahko povzroči tudi smrt, vendar ga najdemo tudi v telesu, saj se metabolizira iz pektina v sadju. Že pri 10 mL čistega metanola se pojavi slepota, saj se zaradi nastale mravljične kisline uniči vidni živec, 30 mL pa je že smrtno nevarna količina. Znaki zastrupitve se pokažejo šele čez nekaj ur. Zaradi podobnosti ga je težko ločiti od etanola. Zaradi zastrupitve so glavobol, vrtoglavica, slabost ter zmedenost, lahko pa povzroči tudi nezavest in smrt.

Metanol je biorazgradljiv v aerobnem kot tudi v anaerobnem okolju, kar pomeni, da ne ostane dolgo v okolici. Razpolovni čas metanola v vodi je en teden, druga goriva pa lahko imajo razpolovni čas tudi več sto dni. Zaradi biorazgradljivosti metanola se ta ne kopiči v podtalnici, površinski vodi, zraku ali zemlji.

2.10 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastna kromatografija je kromatografska tehnika, s pomočjo katere analiziramo sestavo vzorca, pri čemer za določevanje sestave uporabljamo čiste standarde. Izvaja se na ploščah,

katerih podlaga so lahko steklo, aluminijasta ali plastična poliestrska folija, prekrita s tanko plastjo adsorpcijskega sredstva, ki je običajno sestavljen iz aluminijevega oksida, celuloze ali silikatnega gela. Ta plast se imenuje stacionarna faza. Vzorec nanašamo na ploščo in ga nato postavimo v kromatografsko komoro, kjer ga potopimo v topilo ali mešanico topil, ki predstavlja mobilno fazo. V zaprti komori topilo nato potuje od spodaj navzgor in z njim komponente, ki sestavljajo vzorec, le te se na svoji poti ločijo zaradi različne adsorpcijske afinitete na stacionarni fazi in topnosti v mobilni fazi. Razvitemu kromatogramu izmerimo dolžino poti topila ali fronto topila in komponente x v vzorcu ter izračunamo retencijske faktorje R_f vzorcev in jih primerjamo z retencijskimi faktorji standardov.

2.11 Uparjanje

Molekule topila, ki so prešle v plinasto agregatno stanje, nad vsako raztopino tvorijo parni tlak. Ta se s temperaturo večja, ko pa se izenači z zunanjim tlakom, prične tekočina vreti. Prehod iz tekočega v plinasto agregatno stanje pod temperaturo vrelišča imenujemo izhlapevanje, pri temperaturi vrelišča pa izparevanje. Temperatura vrelišča tekočin je odvisna od zunanjega tlaka. Če zunanji tlak znižamo, tekočina zavre pri nižji temperaturi. To dejstvo je pomembno predvsem za termično nestabilne snovi, ki bi pri visoki temperaturi razpadle.

Če topilo popolnoma izpari, govorimo o izparevanju, če izpari delno, pa govorimo o uparjanju. Če raztopine, ki so sestavljene iz raztopljenih trdnih snovi in topila uparjamo, izhajajo pare topila; na ta način se večja koncentracija trdne snovi v preostali raztopini.

Uparjalniki so naprave, v katerih se tekočina ali mešanica tekočin z dovajanjem toplotne energije upari. Pri uparjanju nastane para in koncentrirana raztopina. Poznamo več vrst uparjalnikov:

- Robertov uparjalnik,
- pretočni uparjalnik,
- obtočni uparjalnik,
- tankoplastni uparjalnik.

Postopek uparjanja pod znižanim tlakom se uporablja pri koncentriranju ekstraktov, v farmacevtski industriji in povsod, kjer so prisotne termično neobstoje organske snovi. Uparjanje pod znižanim tlakom poteka tako, da znižamo tlak, s čimer se parni tlak topil zniža, kar povzroči izparevanje topila pri nižjih temperaturah.

2.11.1 Rotavapor

Rotavapor (slika 3) je uparjalnik, ki deluje pod znižanim tlakom in ima možnost nastavitve temperature vodne kopeli do 80° C. Zaradi vrtenja bučke, iz katere uparjamo, se topilo hitreje uparja.



Slika 3: Rotavapor.

2.12 Centrifugiranje

Centrifugiranje je mehanski postopek ločevanja, s katerim hitro ločujemo fino porazdeljene delce trdnih snovi iz suspenzije ob uporabi centrifugalnih sil za pospešeno posedanje. Centrifugalne sile, ki delujejo na tekočinske in trdne delce, so različne, saj se razlikujejo glede na maso ali velikost delcev. Trdni delci se zaradi večje gostote odložijo na stene centrifugirke ali stene bobna centrifuge, pri tem pa nastane bister centrifugat. Hitrost posedanja delcev je v centrifugi od 200- do 1000-krat hitrejša, zato lahko iz suspenzije odstranimo tudi zelo fine delce. Lahko jih ločimo tudi tedaj, ko je razlika v gostoti delcev zelo majhna in jih drugače ne bi mogli ločiti. Ločevanje suspenzij na trdno snov in tekočino v centrifugi ni povsem popolno, možno pa je ločevati tudi emulzije.



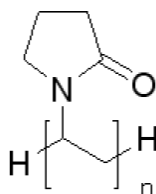
Slika 4: Laboratorijska centrifuga.

2.13 Čiščenje s PVPP smolo

Polivinilpolipirrolidon (PVPP) (slika 5) je zamrežena modifikacija polivinilpirrolidona (PVP). Zaradi močne zamreženosti je netopen v vodi, vendar je sposoben adsorbirati vodo in zato v vodi nabreka.

PVPP lahko uporabimo kot zdravilo, lahko ga zaužijemo kot tableto ali suspenzijo, da adsorbira tako imenovane endotoksine, ki povzročajo diarejo.

PVPP se uporablja za bistrenje tekočin in čiščenje ekstraktov. Z njim odstranjujejo polifenolne spojine in tanine. PVPP tvori vezi, ki so podobne peptidnim vezem v proteinih, zaradi česar obori tanine na podoben način kot proteini.

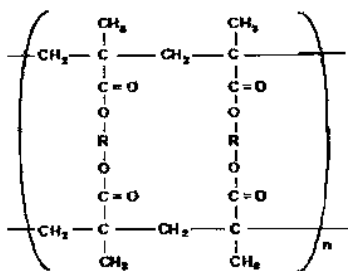


Slika 5: Strukturna formula PVPP-ja.

2.14 Čiščenje s smolo AMBERLITE XAD7HP

AMBERLITE XAD7HP je polimerni adsorbent v obliki belih, v vodi netopnih zrn.

Je ne-ionski alifatski akrilni polimer, ki ima dobre adsorpcijske lastnosti zaradi njegove makrozamrežene strukture in velike adsorpcijske površine (slika 6).



Slika 6: Formula AMBERLITE XAD7HP.

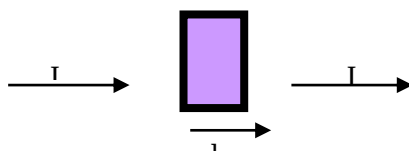
Makrozamrežena struktura daje AMBERLITE XAD7HP odlično termično in fizično stabilnost.

Zaradi alifatske narave lahko z AMBERLITE XAD7HP adsorbiramo tako nepolarne spojine iz vodnih raztopin kot tudi polarne snovi iz nepolarnih topil.

2.15 UV Spektrofotometrija

Pri spektrofotometriji se meri absorpcija svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Spektrofotometrična metoda se uporablja predvsem zaradi njene točnosti, velike občutljivosti in enostavne uporabe. Metodo uporabljamo za določanje vsebnosti elementov v prehrambni in farmacevtski industriji ter ekologiji. Zelo veliko spojin absorbira UV in vidno svetlobo, zato so primerne za kvantitativne analize. Na spojine, ki je ne absorbirajo, pa lahko vplivamo z različnimi kemijskimi reakcijami in jim tako izmerimo absorbanco. Spektrofotometrija se pogosto uporablja v kemiji, fiziki, biokemiji in molekularni biokemiji, pogosto pa se uporablja tudi za forenzične preiskave in študije kemijskih substanc. S spektrofotometrijo lahko ugotovimo, katera spojina se nahaja v vzorcu in kakšna je njena koncentracija.

Slika št. 7 prikazuje, kaj se dogaja z intenziteto monokromatske svetlobe pri prehodu skozi obarvano raztopino:



Slika 7: Intenziteta monokromatske svetlobe pri prehodu skozi obarvano

Spodaj so razloženi osnovni pojmi pri spektrofotometriji:

Definicija prepustnosti - T (transmitanca):

T je delež prepuščene svetlobe.

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

Definicija absorbance – A (optična gostota, ekstinkcija - E):

Absorbanca pomeni slabitev gostote svetlobnega toka zaradi absorpcije in sipanja.

Zveza med T in A:

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right)$$

Beer-Lambertov zakon

Podaja zvezo med množino absorbirane svetlobe in koncentracijo. Za razredčene raztopine velja, da je absorbanca premo sorazmerna koncentraciji vzorca.

$$A = a \cdot l \cdot y \text{ ali } A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

a – absorbtivnost [$1/(\text{cm g L}^{-1})$]

ε - molska absorbtivnost [$1/(\text{cm mol L}^{-1})$]

l – širina kivete [cm]

c – koncentracija vzorca [mol/L]

Za izvajanje te metode potrebujemo spektrofotometer. Ta primerja svetlobo, ki preide skozi slepi vzorec in skozi merjen vzorec. Nekaj svetlobe se absorbira, nekaj pa je pride do detektorja. Beerov zakon, ki velja za razredčene raztopine, podaja absorpcijo svetlobe v odvisnosti od koncentracije.

Spektrofotometer je sestavljen iz monokromatorja, kivete, detektorja in izvora svetlobe. Za različna območja merjenja uporabimo kot vire svetlobe različne žarnice: za območje med 195 nm in 375 nm uporabimo devterijevo, za območje med 350 nm in 1000 nm pa volframovo žarnico.

Monokromator je lahko sestavljen iz optične prizme, optičnega filtra ali optične rešetke. Kivete so narejene iz navadnega ali kvarčnega stekla, tista stran, skozi katero gre svetloba, mora biti gladka in čista, saj to vpliva na rezultate. Detektor na koncu izmeri prepuščeno svetlobo, rezultati pa se izpišejo na zaslonu.

3 PRAKTIČNI DEL

V praktičnem delu so opisane priprava vzorca, postopki ekstrakcije, izolacije in čiščenja ter analizne metode.

3.1 Topnost salicina v različnih topilih

Po preučitvi literature smo izbrali tri ekstrakcijska topila. Zanimala nas je topnost salicina v njih, zato smo izvedli spodaj opisani postopek.

Najprej v epruvete nalijemo 5 mL topila. Na analizno tehtnico postavimo čašo s salicinom, jo stariramo in po majhnih količinah odvzemamo salicin ter ga raztapljamo, dokler se kristalčki ne začnejo izločati na dnu in postane raztopina motna.

Vsako meritev si zapisujemo na list in na koncu izračunamo topnost po enačbi:

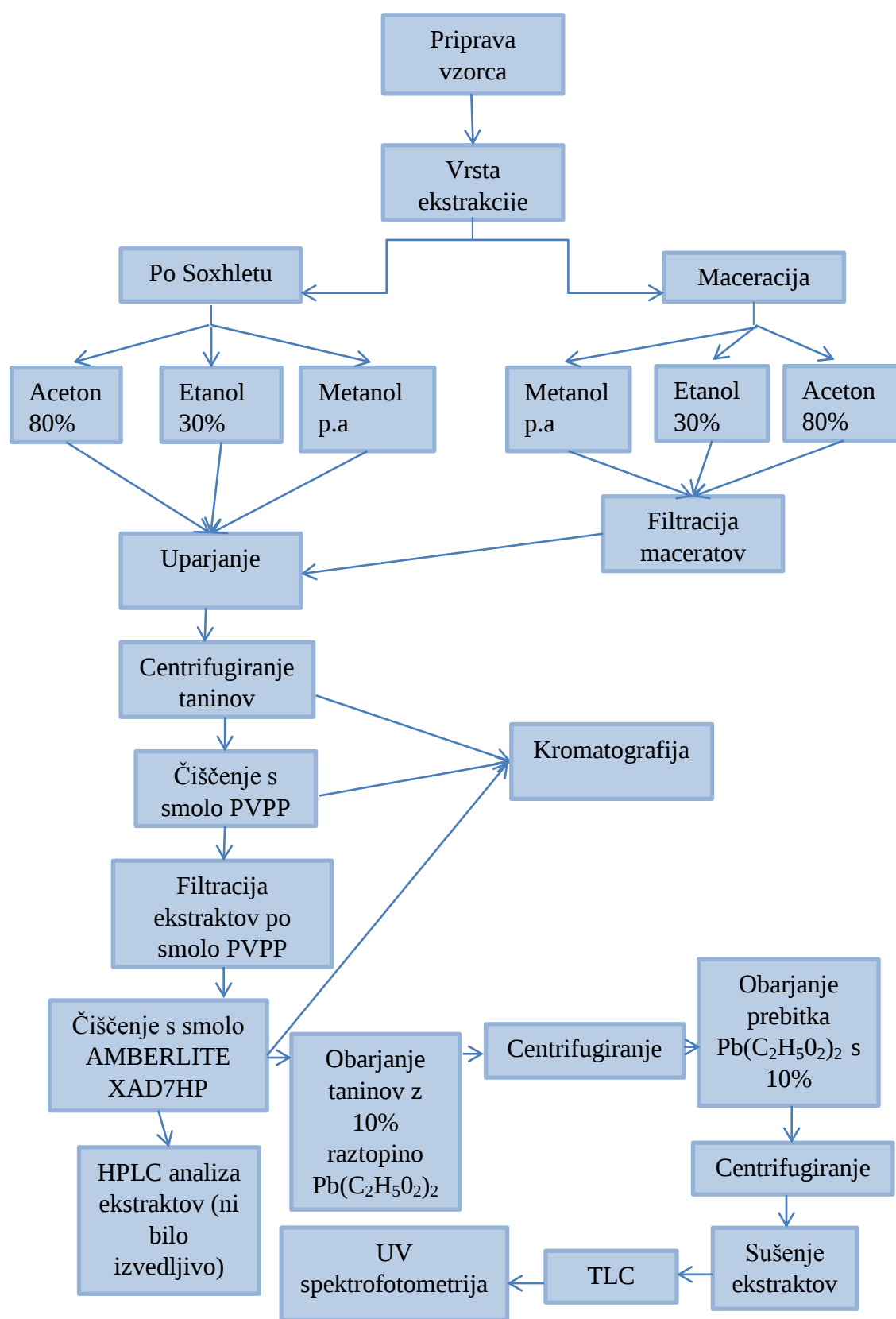
$$topnost = \frac{m_{največje\ topnosti}}{V_{topila}}$$

Dobljeni rezultati so podani v tabeli 2. Vse meritve so izmerjene pri temperaturi 25° C.

Tabela 2: Topnost salicina v uporabljenih topilih.

Topilo	Topnost [g/L]
Aceton	48
Metanol	40
Etanol	52

3.2 Shematski prikaz dela



Slika 8: Shematski prikaz dela.

3.3 Priprava vzorca

Vzorec pripravimo tako, da najprej odstranimo lubje z vej, ga narežemo in posušimo ter nato še dobro zmeljemo. Za to uporabimo inventar v tabeli 3.

Tabela 3: Inventar uporabljen pri pripravi vzorca.

Inventar	Količina
kristalizirka	1 kom
sušilnik	1 kom
eksikator	1 kom
drobilnik znamke Multi blender	1 kom
škarje	1 kom
nož	1 kom
sušilnik za sadje	1 kom

Vejam, ki jih pridobimo z bele vrbe, odstranimo lubje in ga narežemo na manjše delce ter posušimo v sušilniku za sadje. Lubje s pomočjo električnega drobilnika zmeljemo v prah (slika 9). S tem dosežemo večjo površino vzorca, kar je zelo pomembno za ekstrakcijo, saj se z večanjem površine poveča tudi učinkovitost ekstrakcije in tako tudi koncentracija končnega ekstrakta. Zmleto lubje nato vsujemo v označeno kristalizirko volumna 500 mL in sušimo pet ur v sušilniku pri temperaturi 50° C. Presušen vzorec postavimo v eksikator, da se ohladi.



Slika 9: Mletje lubja v drobilniku.

Nato zatehtamo točno določeno količino vzorca. Za ta del uporabimo inventar naveden v tabeli 4.

Tabela 4: Inventar uporabljen pri tehtanju vzorca.

Inventar	Količina
čaša, V = 150 mL	1 kom
jodirka, V = 300 mL	3 kom
zamašek za jodirko	3 kom
plastični lij (s širokim odtokom)	1 kom
žlička s spatulo	1 kom
tulec za ekstrakcijo s Soxhletom	3 kom
vata	/
precizna tehtnica	1 kom

V tri tulce zatehtamo mase zmletga lubja (tabela 5), zamašimo z vato in jih postavimo v Soxhletov aparat.

Tabela 5: Mase vzorcev v tulcih.

Topilo [%]	Masa vzorca v tulcu [g]
aceton 80 %	19,99
etanol 30 %	19,99
metanol	19,99

Enake mase natehtamo tudi v tri jodirke in dolijemo topila (tabela 6).

Tabela 6: Mase vzorcev v jodirkah.

Toplo [%]	Masa vzorca v jodirki [g]	Varnostne oznake topil
aceton 80 %	20,00	Lahko vnetljivo.
etanol 30 %	20,00	Lahko vnetljivo.
metanol	20,00	Strupeno, lahko vnetljivo, posebni vplivi na zdravje.

3.4 Ekstrakcija

3.4.1 Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom

Sestavimo napravo, za ekstrakcijo po Soxhletovi metodi (slika 10). Pri tem uporabimo inventar, naveden v tabeli 7.

Tabela 7: Inventar uporabljen pri ekstrakciji s Soxhletovim aparatom.

Inventar	Količina
Hladilnik	3 kom
laboratorijsko stojalo	3 kom
eksikator	1 kom
trinožno stojalo	3 kom
keramična mrežica	3 kom
gorilnik	3 kom
mufa	6 kom
račvasta prižema	3 kom
okrogla prižema	3 kom
podstavek za bučko	3 kom
vrelna kroglica	9 kom
Bučka	3 kom

Med ekstrakcijo merimo čas in štejemo pretoke (tabela 8).



Slika 10: Ekstrakcija po Soxhletovi metodi s tremi različnimi topili. Od leve proti desni si sledijo: etanol, aceton, metanol.

Tabela 8: Pretoki pri ekstrakciji.

Čas pretokov [min]	1	2	3	4	5	6	7	8
aceton	36:12	42:45	56:21	1:08:50	1:23:53	1:31:27	1:51:26	2:01:25
metanol	23:56	39:33	1:08:12	1:43:34	2:01:55	2:17:18	2:54:54	3:19:20
etanol	55:34	1:13:30	1:31:50	2:00:10	2:21:42	2:44:39	3:06:36	3:31:30

3.4.2 Maceracija

V popisane jodirke natehtamo ustrezno količino zmletega lubja in ga prelijemo s ustrezno količino topila. Inventar, ki ga pri tem uporabljamo, je naveden v tabeli 9.

Tabela 9: Uporabljen inventar pri maceraciji.

Inventar	Količina
jodirka	3 kom
zamašek za jodirko	3 kom
magnetno mešalo	3 kom
teflonski mešalček	3 kom
merilni valj V = 100 mL	3 kom

V jodirke z natehtanim vzorcem (slika 11) nalijemo 90 mL izbranega topila, dodamo teflonski magnetni mešalček in postavimo na magnetno mešalo, da z mešanjem povečamo učinkovitost ekstrakcije.



Slika 11: V jodirke zatehtamo vzorec za maceracijo. Od leve proti desni so etanol, metanol, aceton.



Slika 12: Maceracija z mešanjem suspenzije lubja in izbranih topil. Od leve proti desni so metanol, etanol, aceton.

3.4.2.1 Filtracija macerata

S filtracijo odstranimo ekstrakcijsko goščo. Inventar, ki ga uporabimo pri filtraciji, je naveden v tabeli 10.

Tabela 10: Uporabljen inventar pri filtraciji maceratov.

Inventar	Količina
laboratorijsko stojalo	3 kom
mufa	3 kom
filtrirni obroč	3 kom
kvantitativni lij	3 kom
podlaga za bučko	3 kom
bučka z okroglim dnom in obrušom V = 500 mL	3 kom
steklena palčka	3 kom

Filtriramo čez naguban filtrirni papir v bučke z okroglim dnom, jih zamašimo z zamaški in jih shranimo do uparjanja.

3.5 Uparjanje

Po ekstrakcijah vzorce uparimo na 1/3 začetnega volumna. Inventar, ki ga uporabimo pri uparjanju, je podan v tabeli 11.

Tabela 11: Inventar, uporabljen pri uparjanju.

Inventar	Količina
vrv	1 kom
filtrirni obroč	1 kom
termometer od 0 - 150° C	1 kom
rotavapor	1 kom
vodna črpalka	1 kom
bučka za uparjanje V = 100 mL	6 kom
lovilna bučka	1 kom
sponka	2 kom
silikonska mast	/
mufa	1 kom

Na sliki so prikazani produkti po uparjanju.



Slika 13: Vzorci maceracije po uparjanju. Od leve proti desni si sledijo etanol mac., aceton mac., metanol mac.



Slika 14: Ekstrakti po uparjanju. Od leve proti desni si sledijo aceton sox., aceton mac., metanol sox., metanol mac., etanol sox., etanol mac.

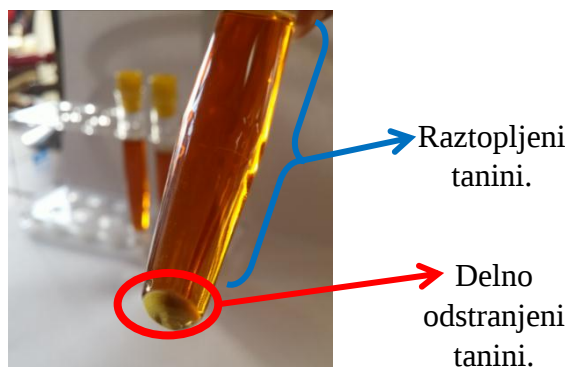
3.6 Centrifugiranje taninov

Ohlajeno tekočino z izločenimi tanini centrifugiramo. Inventar, ki ga uporabimo pri delu, je naveden v tabeli 12.

Tabela 12: Inventar, uporabljen pri centrifugiranju taninov.

Inventar	Količina
epruvete za centrifugiranje	9 kom
zamaški za centrifugirke	9 kom
laboratorijsko stojalo	1 kom
kristalizirka Ø 190mm	1 kom
alkoholni termometer od 0 - 150° C	1 kom
čša V = 150 mL	6 kom
parafilm	/
stojalo za epruvete	1 kom
alkoholni flomaster	1 kom
filtrirni obroč	1 kom

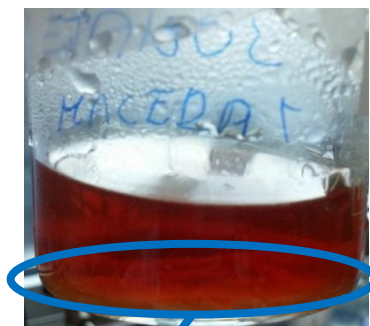
Čašo z nastalo suspenzijo postavimo v hladilnik za 16 ur pri temperaturi 4° C, da odstranimo preostalo oborino, ki vsebuje visoko molekularne derivate in tanine. Temperaturo suspenzije v čašah vzdržujemo z vodno kopeljo (slika 16), ki je imela 4° C. Vsebino čaš oddekantiramo v centrifugirke. Vse centrifugirke napolnimo približno enako, da ohranimo ravnovesje mas v centrifugi. Centrifugo nastavimo na 5000 obratov/minuto za 20 minut. Po centrifugiranju so v centrifugirkah usedline (slika 15). Bistre tekočine oddekantiramo v šest predhodno označenih čaš volumna 150 mL, pokrijemo s parafilmom in postavimo v hladilnik pri 4° C.



Slika 15: Aceton sox. po centrifugiranju.



Slika 16: Hlajenje vzorca.



Izločeni tanini po ohlajanju.

Slika 17: Etanol mac. po 16 h pri 4° C.

3.7 Masa suhega vzorca ekstraktov

S PVPP smolo iz vzorcev odstranimo vodotopne tanine. Maso PVPP, ki jo za to potrebujemo, določimo glede na suho snov v ekstraktih.

Maso suhe snovi posameznih ekstraktov določimo z alikvotom. Od celotne količine ekstraktov odvzamemo približno dva grama in v sušilniku posušimo do suhega. Iz dobljenih podatkov izračunamo delež suhe snovi in s tem pomnožimo maso celotnega ekstrakta, da dobimo celotno maso suhe snovi. V tabeli 13 so prikazane vse našete mase. Pod tabelo so prikazani postopki izračuna.

Tabela 13: Mase izparilnic in vzorcev.

Topilo	Masa prazne izparilnice v g [m ₁]	Masa zatehtanega ekstrakta v g [m ₂]	Masa izparilnice s suho snovjo v g [m ₃]	Masa suhe snovi v g [m ₄]	Delež suhe snovi [w]
acetone po Soxhletu	96,43	2,01	96,54	0,11	0,0547
metanol po Soxhletu	91,73	2,00	91,893	0,163	0,0815
etanol po Soxhletu	97,13	2,04	97,183	0,053	0,0260
acetone po maceraciji	89,14	2,03	89,263	0,123	0,0606
metanol po maceraciji	89,565	2,00	89,63	0,0683	0,0315
etanol po maceraciji	95,075	2,04	95,18	0,1725	0,0846

Da bi dobili le maso suhe snovi (m₄), je potrebno odšteti maso prazne izparilnice (m₁) od mase izparilnice s suho snovjo (m₃). Spodnja enačba prikazuje izračun mase suhe snovi acetona po metodi Soxhleeta, vse ostale mase pa se izračunajo po isti formuli in so prikazane v tabeli 14.

$$m_4 = m_3 - m_1$$

$$m_4 = 96,54 \text{ g} - 96,43 \text{ g}$$

$$m_4 = 0,11 \text{ g}$$

Dobljeno maso nato delimo z maso zatehtanega ekstrakta (m_2), da dobimo delež suhe snovi v vzorcu ekstrakta (w). V spodnji enačbi je prikazan ta izračun v primeru, ko je topilo aceton in smo uporabili metodo po Soxhletu. Tudi ti deleži so prikazani v tabeli 14.

$$w = \frac{m_4}{m_2}$$

$$w = \frac{0,11 \text{ g}}{2,01 \text{ g}}$$

$$w = 0,0547$$

Po izračunanem deležu suhe snovi v vzorcu potrebujemo še maso PVPP smole, ki jo potrebujemo za odstranitev taninov iz vzorca. V tabeli 14 so prikazane vse mase, potrebne za izračun PVPP smole, pod njo pa izračuni.

Tabela 14: Mase čaš z vzorci in brez njih.

Topilo	Masa prazne čaje v g [m_5]	Masa čaše z vzorcem v g [m_6]	Masa ekstrakta v g [m_7]	Masa potrebne PVPP smole v g [m_{PVPP}]
aceton po Soxhletu	106,82	129,61	22,79	0,0624
metanol po Soxhletu	100,36	116,88	16,52	0,0673
etanol po Soxhletu	121,70	183,27	61,57	0,0800
aceton po maceraciji	102,86	137,20	34,34	0,1040
metanol po maceraciji	119,46	149,24	29,78	0,0838
etanol po maceraciji	123,08	142,90	19,82	0,0508

V ta namen zatehtamo prazno čašo in vanjo izlijemo vzorec. Nato čašo še enkrat zatehtamo. Maso ekstrakta (m_7) dobimo tako, da odštejemo maso čaše (m_5) od mase čaše z vzorcem (m_6). Spodnja enačba prikazuje primer izračuna mase ekstrakta pri uporabi acetona po Soxhletovi metodi. Vse ostale mase so prikazane v tabeli 14.

$$m_7 = m_6 - m_5$$

$$m_7 = 129,61 \text{ g} - 106,82 \text{ g}$$

$$m_7 = 22,79 \text{ g}$$

Po izračunani masi ekstrakta izračunamo še maso PVPP smole. To storimo tako, da maso ekstrakta (m_8) pomnožimo z deležem suhe snovi (w), nato pa vse skupaj delimo z 20. Ta izračun je za primer, ko je za topilo uporabljen aceton in metoda po Soxhletu. Ostale mase so prikazane v tabeli 14.

$$m_{PVPP} = \frac{m_7 \cdot w}{20}$$

$$m_{PVPP} = \frac{22,79 \text{ g} \cdot 0,0547}{20}$$

$$m_{PVPP} = 0,0624 \text{ g}$$

3.8 Čiščenje s smolo PVPP

Za odstranitev v vodi netopnih taninov uporabimo PVPP smolo ali polivinilpolipirolidon. Inventar in kemikalije, ki smo jih pri tem uporabili, so navedeni v tabelah 15 in 16.

Tabela 15: Uporabljen inventar pri čiščenju s smolo PVPP.

Inventar	Količina
analizna tehtnica	1 kom
spatula	1 kom
tehtalna ladijca	1 kom
teflonski mešalček	1 kom
parafilm	/
magnetno mešalo	1 kom

Tabela 16: Uporabljene kemikalije pri čiščenju s smolo PVPP.

Kemikalija	Varnostne oznake
PVPP	/

Na analizni tehtnici zatehtamo za vsak ekstrakt posebej izračunano količino smole PVPP in jo dodamo v čaše z ekstrakti. V čaše damo mešalčke, pokrijemo s parafilmom, da preprečimo izhlapevanje, in na magnetnem mešalu mešamo eno uro (slika 18).



Slika 18: Čiščenje s PVPP smolo.

3.9 Filtracija ekstraktov po čiščenju s smolo PVPP pod znižanim tlakom

Da bi odstranili smolo PVPP in nanj vezane v vodi netopne tanine, ekstrakte filtriramo pod znižanim tlakom (slika 19). Inventar, ki ga za to uporabimo, je naveden v tabeli 17.

Tabela 17: Inventar za čiščenje s PVPP smolo.

Inventar	Količina
filtrirni papir (rdeči trak)	6 kom
škarje	1 kom
nuča	6 kom
prisesalna buča	6 kom
steklena palčka	6 kom
vodna črpalka	6 kom
čša V = 150 mL	6 kom



Slika 19: Nučiranje smole PVPP in nanje vezanih v vodi netopnih taninov v etanolu sox.

3.10 Čiščenje s smolo AMBERLITE XAD7HP

Za odstranitev vodotopnih taninov uporabimo smolo AMBERLITE XAD7HP in inventar, naveden v tabeli 18.

Tabela 18: Inventar, ki smo ga uporabili pri čiščenju s smolo AMBERLITE XAD7HP.

Inventar	Količina
žlička s spatulo	1 kom
lij	1 kom
lij kapalnik V = 100 mL	5 kom
lij ločnik V = 100 mL	1 kom
laboratorijsko stojalo	3 kom
mufa	6 kom
račvasta prižema	5 kom
filtrirni obroč	1 kom
vata	/
čša V = 600 mL	3 kom
bučka z obrusom V = 100 mL	6 kom
zamašek za bučko	6 kom

Tabela 19: Inventar kemikalij, uporabljen pri čiščenju s smolo AMBERLITE XAD7HP.

Kemikalija	Varnostne oznake
AMBERLITE XAD7HP	/
etanol 100 %	Lahko vnetljiv.

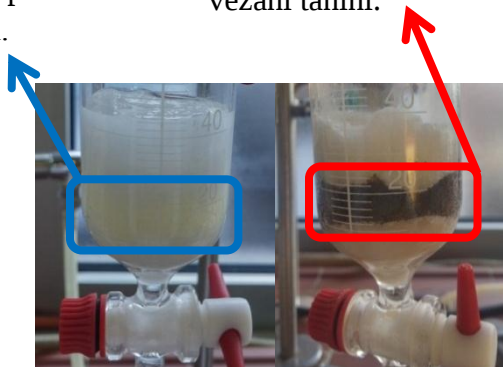
Najprej pripravimo čistilno kolono (slika 21), in sicer tako, da v lije kapalnike vstavimo vato do oznake 10 mL in nato s pomočjo lija in žličke s spatulo vanj vsujemo smolo AMBERLITE XAD7HP do oznake 20 mL in omočimo z deionizirano vodo za 20 minut. Nato vodo izlijemo in pokrijemo zgornji del smole z vato ter ponovno omočimo z vodo do nivoja vate. Nato ekstrakte prelijemo v lij dokapalnik in jih sestavimo s kolono z AMBERLITE XAD7HP ter počasi dokapavamo ekstrakte od zgoraj. Naš produkt se adsorbira na smolo, iztok iz kolone pa lovimo v čašo in ga zavržemo. Ko ves ekstrakt preteče skozi kolono, jo izperemo - eluiramo z etanolom - in eluat prestrežemo v 100 mL bučke z obrusi in jih zamašimo do uparjanja.



Slika 20: Eluacija AMBERLITE XAD7HP.

AMBERLITE XAD7HP pred čiščenjem.

AMBERLITE XAD7HP po čiščenju in nanje vezani tanini.



Slika 21: Čistilna kolona AMBERLITE XAD7HP.

3.11 Kromatografija

Za pripravo zmesi topil, ki sestavljajo mobilno fazo, izberemo kombinacijo etil acetata (77 %), vode (10 %) in metanola (13 %). Postopek je opisan in dostopen na internetni strani <http://goo.gl/98636B> (14.11.2014).

Inventar, ki ga uporabimo pri tankoplastni kromatografiji, je naveden v tabeli 20 .

Tabela 20: Uporabljen inventar pri TLC.

Inventar	Količina
kromatografska plošča SiO ₂ z Al podlago	3 kom
Kapilare	/
grafitni svinčnik	1 kom
rokavice	1 kom
fen	1 kom
kromatografska komora	2 kom
točkalo	1 kom
ravnilo	1 kom
epruvetke za vzorce	12 kom
merilni valj V = 200 mL	1 kom
merilni valj V = 150 mL	1 kom
merilni valj V = 100 mL	
UV komora	1 kom
UVA in UVB luč	1 kom

Kemikalije, ki jih uporabimo pri tankoplastni kromatografiji, so navedene v tabeli 21 skupaj z izračunanimi količinami topil.

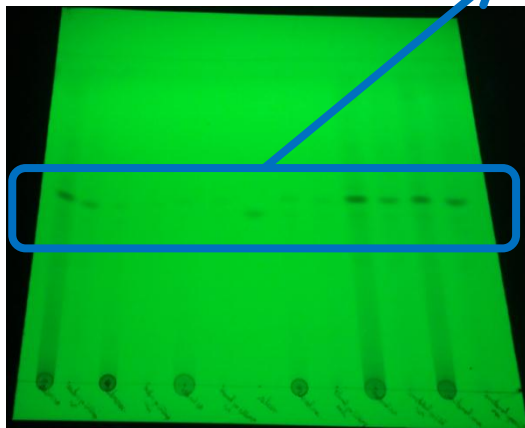
Tabela 21: Uporabljene kemikalije pri TLC z izračunanimi volumni.

Kemikalija	Varnostne oznake	Sestava	Izračunana količina [mL]
etil acetat	Lahko vnetljivo, dražilno, akutna nevarnost.	100 %	154
deionizirana voda	/	/	20
metanol	Strupeno, lahko vnetljivo, posebni vplivi na zdravje.	100 %	26
salicin standard	Dražilno.	p.a.	/

Pripravljeno mobilno fazo nalijemo v kromatografsko komoro do višine 1,5 cm. Komoro pokrijemo za 50 minut, da se nasiti s parami topila. Medtem pripravimo kromatogram. Na ploščo za tankoplastno kromatografijo narišemo startno linijo, in sicer dva centimetra od spodnjega roba, in jo označimo s pikami. Na startno črto narišemo 13 točk, kamor s pomočjo kapilar naneseemo vse vzorce in standard. Ploščo posušimo, postavimo v komoro in pustimo 50 minut, da se razvije. Posušen kromatogram postavimo v UV komoro in opazujemo pod različnimi valovnimi dolžinami UVA.

Kromatogram je prikazan na sliki

Največjo koncentracijo salicina opazimo pri ekstrakciji acetona in metanola, medtem ko je najvišja koncentracija salicina po čiščenju opazna pri ekstrakciji z metanolom.



Slika 22: Kromatogram ekstraktov pred čiščenjem in po njem. Od leve proti desni: aceton sox., aceton sox. po čiščenju, aceton mac., aceton mac. po čiščenju, etanol sox., etanol sox. po čiščenju, salicin, etanol mac., etanol mac. po čiščenju, metanol sox., metanol sox. po čiščenju, metanol mac., metanol mac. po čiščenju.

3.11.1 Izračun retenzijskih faktorjev

Retenzijske faktorje izračunamo po formuli:

$$Rf = \frac{\text{razdalja komponente (x) od starta}}{\text{razdalja topila od starta}}$$

Retenzijski faktorji za posamezne ekstrakte, ekstrakte po čiščenju in standardom salicina so podani v tabeli 22.

Tabela 22: Retenzijski faktorji.

Ekstrakt	Razdalja komponente x od startne linije [cm]	Rf
aceton sox.	8,3	0,525
aceton sox. po čiščenju	7,9	0,5
aceton mac.	7,9	0,5
aceton mac. po čiščenju	7,8	0,494
etanol sox.	8,3	0,525
etanol sox. po čiščenju	8,3	0,525
etanol mac.	8,3	0,525
etanol mac. po čiščenju	8,3	0,525
metanol sox.	8,3	0,525
metanol sox. po čiščenju	8,3	0,525
metanol mac.	8,3	0,525
metanol mac. po čiščenju	8,3	0,525
salicin standard	7,9	0,5
razdalja topila	15,8	/

3.12 Uparjanje eluatov

Za koncentriranje ekstraktov ponovno uporabimo uparjanje z rotavaporjem. Vzorci ekstraktov po uparjanju so prikazani na sliki 23.



Slika 23: Vzorci po uparjanju. Iz leve proti desni si sledijo aceton sox., etanol sox., metanol sox., aceton mac., etanol mac., metanol mac.

3.13 Priprava raztopin za obarjanje

Po čiščenju ekstraktov s PVPP in AMBERLITE XAD7HP ter uparjanju je bil naš namen analizirati vzorce s HPLC metodo. Ker v šoli naprave nimamo, smo kontaktirali podjetja, ki jo imajo, vendar niso imeli ustreznih kolon, zato smo se odločili, da koncentracijo salicina določimo spektrofotometrično. Za to metodo je bilo potrebno odstraniti vse odvečne tanine iz ekstraktov z dodajanjem prebitne količine raztopine $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ in obarjanjem presežka te raztopine z raztopino Na_2HPO_4 .

3.13.1 Priprava 10 % raztopine $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$

Inventar, ki ga uporabimo, je naveden v tabeli 23.

Tabela 23: Uporabljen inventar pri pripravi $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$.

Inventar	Količina
magnetno mešalo	1 kom
teflonski mešalček	1 kom
čša V = 250 mL	1 kom
plastična žlička	1 kom
precizna tehtnica	1 kom

Za pripravo 150 g 10 % raztopine svinčevega acetata izračunamo maso topljenca po spodnji enačbi:

$$m_b = w \cdot m_{ab}$$

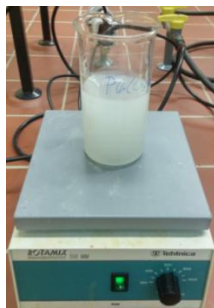
$$m_b = 0,1 \cdot 150 \text{ g}$$

$$m_b = 15 \text{ g}$$

Na precizno tehtnico postavimo čašo in jo stariramo. Vanjo zatehtamo 15 g svinčevega acetata in z destilirano vodo dopolnimo do končne mase 150 g. V čašo damo teflonski mešalček in jo postavimo na magnetno mešalo (slika 24). Nastavimo primerno hitrost mešanja in pustimo, da se svinčev acetat raztopi.

Tabela 24: Tabela kemikalij pri pripravi raztopine.

Kemikalija	Varnostne oznake
$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ w = 10 %	Oksidativno, dražilno, strupeno, karcinogeno.



Slika 24: Pripravljanje raztopine $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$.

3.13.2 Priprava 10 % raztopine Na_2HPO_4

Inventar, ki ga uporabimo, je naveden v tabeli 25.

Tabela 25: Uporabljen inventar pri pripravi NaHPO_4 .

Inventar	Količina
magnetno mešalo	1 kom
teflonski mešalček	1 kom
čša V = 100 mL	1 kom
plastična žlička	1 kom
precizna tehtnica	1 kom

Pripraviti moramo 10 % raztopino natrijevega hidrogen fosfata(V).

Iz spodnje enačbe izračunamo maso natrijevega hidrogen fosfata(V), ki ga zatehtamo:

$$m_b = w \cdot m_{ab}$$

$$m_b = 0,1 \cdot 70 \text{ mL}$$

$$m_b = 7 \text{ g}$$

Na precizno tehtnico postavimo čašo in jo stariramo. Vanjo zatehtamo 7 g natrijevega hidrogen fosfata in z destilirano vodo dopolnimo do končne mase, ki je bila 70 g. V čašo damo teflonski mešalček in jo postavimo na magnetno mešalo (slika 25). Nastavimo primerno

hitrost mešanja in pustimo, da se natrijev hidrogen fosfat raztopi. Zaradi slabe topnosti moramo raztopino še segrevati.

Tabela 26: Tabela kemikalij, uporabljenih pri pripravi raztopine.

Kemikalija	Varnostne oznake
Na_2HPO_4 w = 10 %	Dražilno.



Slika 25: Pripravljanje raztopine Na_2HPO_4 .

3.14 Obarjanje

3.14.1 Obarjanje taninov s $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ in centrifugiranje le-teh

Za odstranjevanje motečih taninov uporabimo 10 % raztopino svinčevega acetata. Inventar in kemikalije, ki jih uporabimo pri delu, so navedene v tabelah 27 in 28.

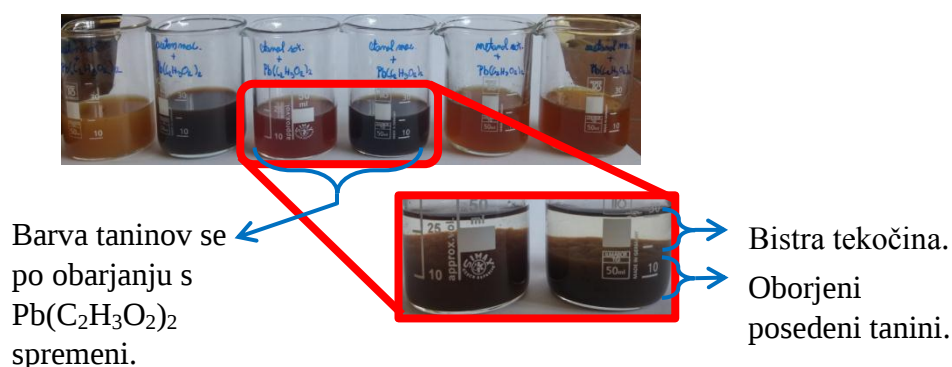
Tabela 27: Uporabljen inventar pri obarjanju taninov.

Inventar	Količina
stojalo za epruvete	1 kom
centrifugirke	/
zamaški za centrifugirke	/
centrifuga	1 kom
čša V = 50 mL	6 kom
merilni valj V = 25 mL	6 kom
merilni valj V = 10 mL	1 kom
steklena palčka	6 kom

Tabela 28: Uporabljene kemikalije pri obarjanju taninov.

Kemikalija	Varnostne oznake	Volumen [mL]
$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ w = 10 %	Oksidativno, dražilno, strupeno, karcinogeno.	70

V označene čaše odmerimo 20 mL ekstrakta in dodamo 10 mL 10 % raztopine $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ter dobro premešamo (slika 26). Pri tem se tanini v raztopini oborijo. Po obarjanju ekstrakte prelijemo v že označene centrifugirke in jih dobro zamašimo. Centrifugirke vstavimo v centrifugo in centrifugiramo 20 minut pri 5000 obratih na minuto. Po končanem centrifugiranju bister ekstrakt prelijemo v že označene čaše.



Slika 26: Oborjeni tanini.

3.14.2 Obarjanje prebitka $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ z Na_2HPO_4 in centrifugiranje oborine

Za odstranitev prebitka svinčevega acetata uporabimo natrijev hidrogen fosfat(V). Inventar in kemikalije, ki jih uporabimo pri delu, so navedene v tabelah 29 in 30.

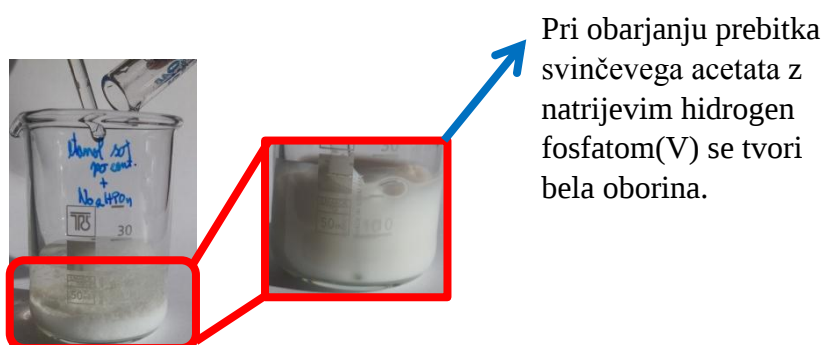
Tabela 29: Uporabljen inventar pri obarjanju prebitka $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$.

Inventar	Količina
merilni valj V = 5 mL	1 kom
steklena palčka	6 kom
stojalo za epruvete	1 kom
centrifugirka	/
zamašek za centrifugirko	/
centrifuga	1 kom
izparilnica $\varnothing = 95$ mm	6 kom

Tabela 30: Uporabljene kemikalije pri obarjanju prebitka $Pb(C_2H_3O_2)_2$.

Kemikalija	Varnostne oznake	Volumen [mL]
$NaHPO_4$ w = 10 %	Dražilno.	15

V označene čaše s čistim ekstraktom, ki vsebuje prebitek $Pb(C_2H_3O_2)_2$, s pomočjo merilnega valja odmerimo 2 mL 10 % raztopine Na_2HPO_4 in dobro premešamo (slika 27). Pri obarjanju nastane bela oborina, ki se je takoj posede. V že označene centrifugirke nalijemo ekstrakte in jih dobro zamašimo. Centrifugirke vstavimo v centrifugo, nastavljeno na 5000 obratov/minuto ter centrifugiramo 20 minut. Bistro tekočino prelijemo v označene izparilnice.



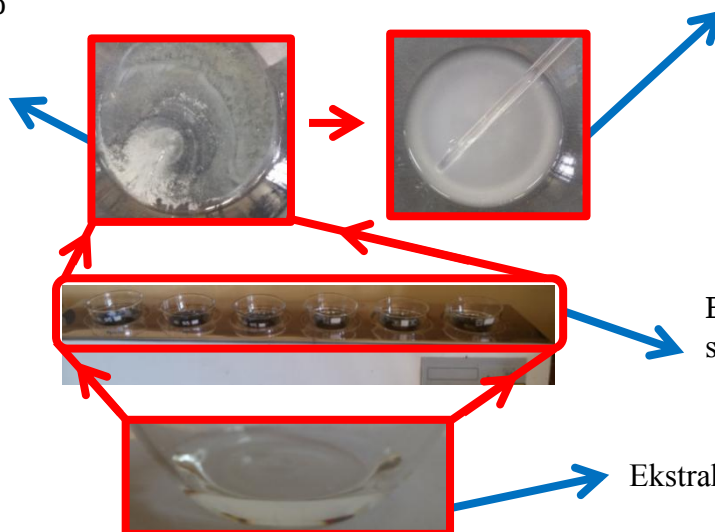
Pri obarjanju prebitka svinčevega acetata z natrijevim hidrogen fosfatom(V) se tvori bela oborina.

Slika 27: Etanol sox. po obarjanju prebitka svinčevega acetata z natrijevim hidrogen fosfatom.

3.15 Sušenje ekstraktov

Za sušenje ekstraktov uporabimo vodno kopel, prikazano na sliki 28.

Pri ekstraktu se po sušenju na dnu tvorijo beli snežinkasti kristalčki.



Suhi ekstrakti raztopljeni v p.a. etanolu.

Ekstrakti med sušenjem v kopeli.

Ekstrakt pred sušenjem.

Slika 28: Vzorci v vodni kopeli.

Ekstrakte v izparilnicah postavimo v vodno kopel, ki jo predhodno segrejemo na max 45° C, da preprečimo termični razkroj salicina v ekstraktih. Ekstrakte izhlapevamo do suhega približno 5 ur.

3.16 Tankoplastna kromatografija alikivotnega dela

Za izolacijo salicina iz ekstraktov po čiščenju uporabimo kvantitativno metodo tankoplastne kromatografije.

Suhim ekstraktom dodamo 20 mL 100 % etanola in premešamo, da se ekstrakt raztopi. Nato izvedemo tankoplastno kromatografijo.

Inventar, ki ga uporabimo, je naveden v tabeli 31.

Tabela 31: Inventar uporabljen pri TLC.

Inventar	Količina
kromatografska plošča SiO ₂ z Al podlago	6 kom
kromatografske komore	3 kom
grafitni svinčnik	1 kom
fen	1 kom
kapilara	1 kom
čaša V = 25 mL	7 kom
erlenmajerica V = 600 mL	1 kom
gumijast zamašek	1 kom
steklena palčka	1 kom
merilni valj V = 500 mL, 100 mL, 5 mL	/
merilna pipeta V=1 mL	1 kom
nastavek za pipetiranje	1 kom
UV komora	1 kom
UVA/UVB svetilka	1 kom
rokavice	1 kom
spatula	1 kom
ahatna terilnica s pestilom	2 kom
stojalo za epruvete	1 kom

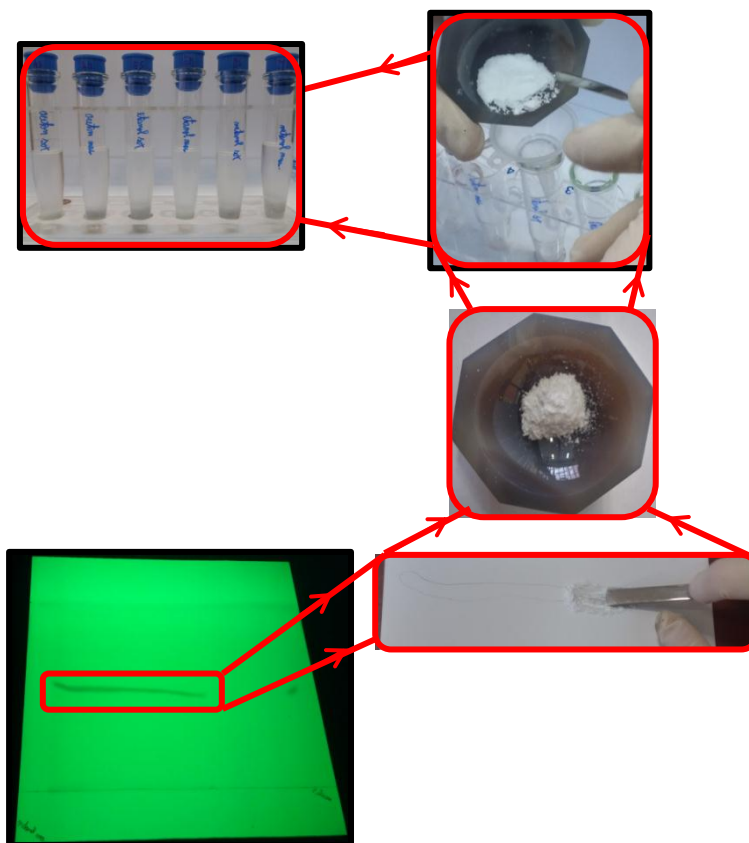
centrifugirke	6 kom
zamašek za centrifugirko	6 kom
lij	6 kom
stresalnik	1 kom

Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri delu so navedene v tabeli 32.

Tabela 32: Kemikalije, uporabljene pri TLC.

Kemikalija	Sestava	Varnostne oznake
etanol	p.a.	Lahko vnetljivo.
etil acetat	100 %	Lahko vnetljivo, dražilno, akutna nevarnost.
deionizirana voda	/	/
metanol	100 %	Strupeno, lahko vnetljivo, posebni vplivi na zdravje.
salicin standard	p.a.	Dražilno.

Najprej pripravimo mobilno fazo, in sicer tako, da uporabimo enaka topila kot pri prejšnjih tankoplastnih kromatografijah, ter jo prelijemo v kromatografske komore do višine enega centimetra. Po tem pripravimo 6 plošč, in sicer tako, da narišemo startno linijo na višini treh centimetrov. Od robov odmerimo en centimeter in na eno stran naneseemo raztopino salicina. S pomočjo merilne pipete odpipetiramo 0,1 mL raztopine iz izparilnice, kar predstavlja alikvotni del od celotne količine – 20 mL. Te naneseemo na plošče tako, da s pipeto povlečemo po plošči in s tem naredimo tanjšo črto. Vse plošče posušimo s fenom in jih postavimo v kromatografske komore z mobilno fazo. Po eni uri topilo doseže višino 12 centimetrov, nakar kromatograme vzamemo iz kadičke in jih posušimo s fenom. Kromatograme postavimo v UV komoro pod UVA (366 nm) svetlobo in lise salicina obkrožimo z grafitnim svinčnikom. Označene lise spraskamo s spatulo (slika 29) in jih kvantitativno prenesemo v ahatne terilnice, kjer jih s pestilom fino uprašimo. Prah ponovno kvantitativno prenesemo v označene centrifugirke. Vzorcem nato z merilnim valjem odmerimo pet mililitrov čistega etanola (slika 29) za elucijo salicina, zamašimo in vpnemo v stresalnik ter stresamo eno uro na maksimalni hitrosti. Po končanem stresanju centrifugirke postavimo v centrifugo, kjer jih centrifugiramo 20 minut na maksimalni nastavitvi. Po končanem centrifugiranju bistre eluate prelijemo v označene čaše in jih razredčimo na 20 mL s p.a etanolom.



Slika 29: Pridobivanje vzorca s kromatogramske plošče in vzorec v centrifugirki z elucijsko tekočino.

3.17 Priprava raztopin za umeritveno krivuljo

Inventar, ki ga uporabimo pri pripravi raztopin, je naveden v tabeli 33.

Tabela 33: Uporabljen inventar pri pripravi raztopin za umeritveno krivuljo.

Inventar	Količina
merilna bučka V = 250 mL	1 kom
merilna bučka V = 100 mL	6 kom
zamašek za merilno bučko	7 kom
čaša V = 25 mL	1 kom
steklena palčka	1 kom
analizna tehtnica	1 kom
žlička	1 kom
mali lij	1 kom
čaša V = 600 mL	1 kom
bireta V = 50 mL	1 kom
Mufa	2 kom
oglata prižema	2 kom
laboratorijsko stojalo	1 kom
kapalka	1 kom
spektrofotometer	1 kom
kivete	6 kom

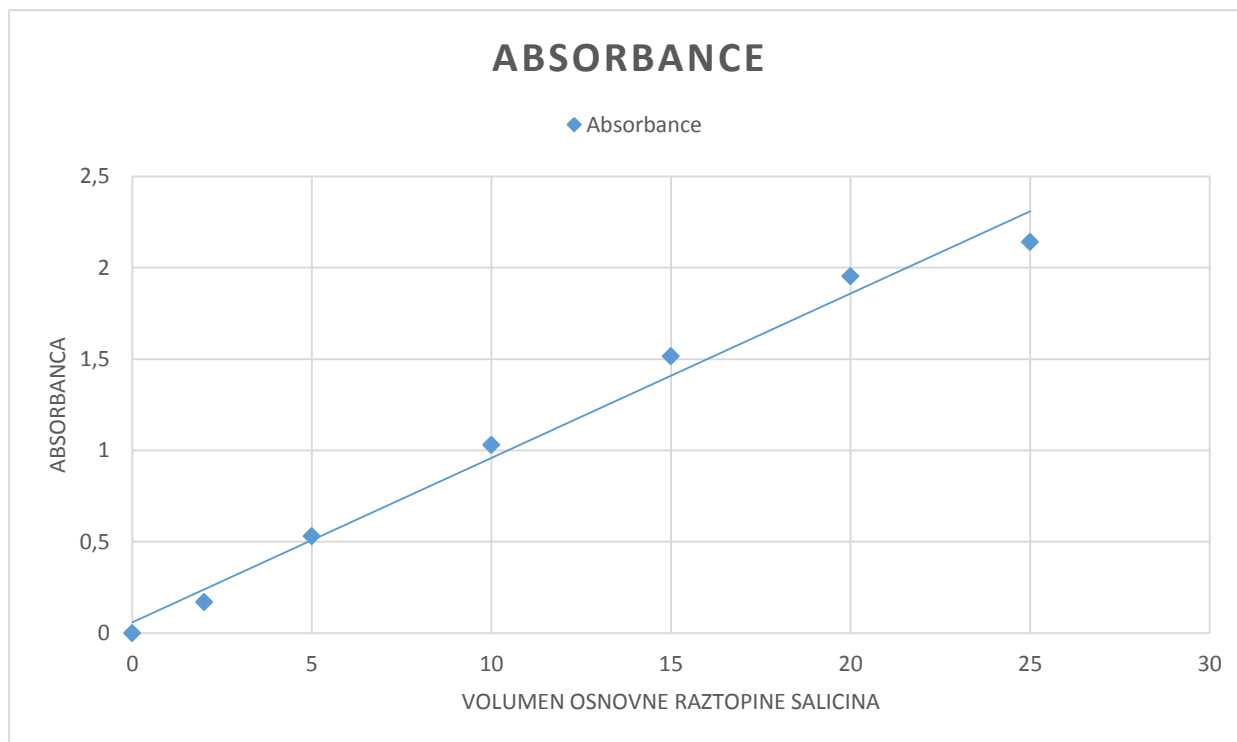
Umeritveno krivuljo izdelamo z osnovno raztopino salicina. V ta namen najprej v 25 mL čašo na analizni tehtnici odtehtamo 0,8 g salicina in dolijemo 100 % etanol. Vsebino premešamo s stekleno palčko, da se ves salicin raztopi. Nato raztopino kvantitativno prenesemo v 250 mL merilno bučko, dopolnimo s 100 % etanolom do oznake ter dobro premešamo.

Z redčenjem osnovne raztopine salicina pripravimo še šest raztopin za umeritveno krivuljo. Z bireto odmerimo v 100 mL bučke 2, 5, 10, 15, 20 in 25 mL osnovne raztopine, jih s 100 % etanolom razredčimo do oznake in dobro premešamo. Raztopinam izmerimo absorbanco na spektrofotometru. Vrednosti so podane v tabeli 34.

Tabela 34: Absorbance pri umeritveni krivulji.

Volumen [mL]	Absorbanca
2	0,170
5	0,532
10	1,030
15	1,516
20	1,954
25	2,142

Na sliki 30 je prikazana umeritvena krivulja, ki prikazuje absorbanco v odvisnosti od koncentracije salicina.



Slika 30: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije salicina.

3.18 Spektrofotometrično določanje salicina v ekstraktih

Po meritvah absorbance raztopin za izdelavo umeritvene krivulje izmerimo absorbanco še vsem šestim ekstraktom. Iz izmerjenih absorbanc posameznih ekstraktov, iz umeritvene krivulje določimo koncentracijo salicina v vzorcih. Vrednosti absorbance, masne koncentracije salicina in mase salicina v alikvotu oziroma v celotni količini ekstrakta, so podane v tabeli 35.

Tabela 35: Absorbance vzorcev z izračunanimi masami.

Vzorec	Absorbanca	salicina γ po kromatografiji [g/L]	Masa salicina v alikvotu (0,1 mL) [g]	Celotna masa salicina [g]
acetone Soxhlet	0,040	0,01335	0,000267	0,05339
acetone macerat	0,031	0,01034	0,0002068	0,04136
metanol Soxhlet	0,075	0,02503	0,0005006	0,10012
metanol macerat	0,045	0,01502	0,0003004	0,06008
etanol Soxhlet	0,010	0,00334	0,0000668	0,01336
etanol macerat	0,021	0,00701	0,0001402	0,02804

Postopek preračuna mas salicina v ekstraktih je prikazan spodaj:

Najprej odčitamo poljubno točko na povprečnici T(10, 0,959), nato pa izračunamo masno koncentracijo po križnem računu, pred tem pa moramo izračunati še masno koncentracijo raztopine, ki smo jo pripravili iz 10 mL osnovne raztopine. Ta je 0,32 g/L.

$$\gamma = \frac{ABS \text{ (vzorec)} \cdot 0,32 \frac{g}{L}}{ABS \text{ (pri 10 mL)}}$$

$$\gamma = \frac{0,040 \cdot 0,32 \frac{g}{L}}{0,959}$$

$$\gamma = 0,01335 \frac{g}{L}$$

Nato pomnožimo γ z 0,02 L, ker smo vzorec po kromatografiji razredčili na 20 mL. Nato naredimo še en križni račun in izračunamo maso pred kromatografijo. Ker smo odvzeli 0,1 mL s pipeto in je bila v njem masa po kromatografiji, smo 20 mL, kolikor je bilo vzorca, prej pomnožili z maso po kromatografiji in zmnožek delili z 0,1.

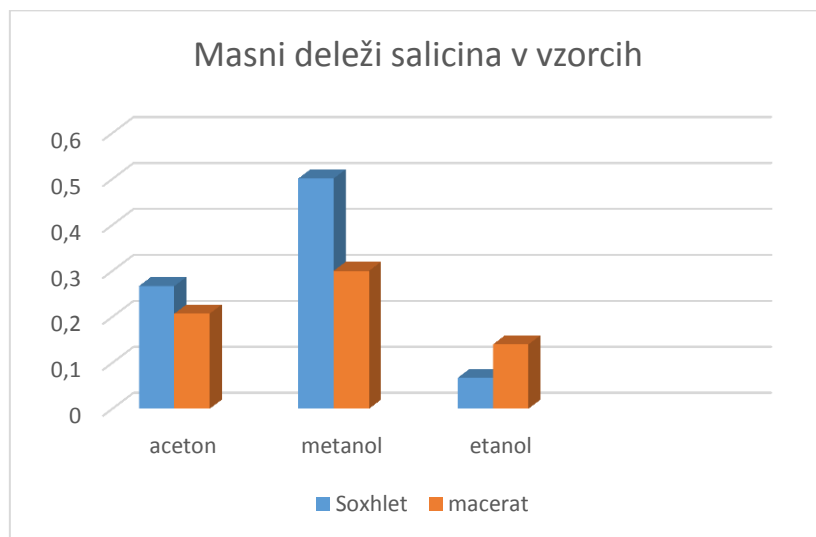
$$m = \frac{m \text{ (po kromatografiji)} \cdot 20 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}}$$

4 REZULTATI

Pri raziskovalni nalogi smo dobili rezultate, ki so podani v tabeli št. 36 in sliki št. 31.

Tabela 36: Tabela rezultatov.

Ekstrakt	Masa lubja [g]	Masni delež suhe snovi [%]	Masa celokupne suhe snovi [g]	Masa salicina v masi lubja [g]	Masni delež salicina [%]
acetone sox.	19,99	5,47	1,2466	0,05339	0,267
acetone mac.	20,00	6,06	2,0810	0,04136	0,207
metanol sox.	19,99	2,60	1,6008	0,10012	0,501
metanol mac.	20,00	8,46	1,6768	0,06008	0,300
etanol sox.	19,99	8,15	1,3464	0,01336	0,067
etanol mac.	20,00	3,15	0,9381	0,02804	0,140



Slika 31: Graf odvisnosti masnega deleža salicina v vzorcih od ekstrakcijskega topila in ekstrakcijske metode.

Iz rezultatov je razvidno, da je največji izkoristek ekstrakcije salicina iz lubja bele vrbe pri uporabi Soxhletove metode z metanolom.

5 RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK

Namen te naloge je bil primerjati različne ekstrakcijske metode in topila za ekstrakcijo salicina iz lubja bele vrbe.

Hipotezi, ki smo si ju zastavili, sta bili:

1. Ekstrakcija po Soxhletovi metodi bo učinkovitejša.
2. Glede na topnost salicina v uporabljenih topilih sklepamo, da bo največji izkoristek pri etanolu.

Prvo hipotezo smo delno potrdili, saj je bila ekstrakcija s Soxhletovo metodo učinkovitejša z uporabo metanola in acetona. Pri etanolu pa je bila metoda po maceraciji primernejša, kar je razvidno iz grafa na sliki 31.

Druge hipoteze nismo potrdili, saj smo največji izkoristek dobili pri ekstrakciji z uporabo metanola.

Zato bi priporočali ekstrakcijo po Soxhletovi metodi, in sicer z uporabo metanola, pri čemer bi bilo potrebno postopek usmeriti tako, da bi se metanol lahko znova uporabil kot in da bi bila, zaradi njegove toksičnosti, zagotovljena popolna odstranitev iz končnega produkta. Pri tem bi priporočali uparjanje pod znižanim tlakom, in sicer zato, ker je salicin termično neobstoje.

Namen naše naloge je bil dosežen, lahko bi nadaljevali z uporabo najboljšega topila in metode. Lahko bi preizkusili tudi druga topila, ki so okolju in človeku neškodljiva. V prihodnje bi si želeli tudi sprotno kontrolo sestave ekstrakta po metodi HPLC.

LITERATURA:

<http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Creslovina> (5.1.2015)

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Topoli> (6.1.2015)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Salicin> (5.1.2015)

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Aceton> (7.1.2015)

<http://www.slovenskenovice.si/lifestyle/bivanje/tako-lahko-uporabite-aceton> (7.1.2015)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol> (7.1.2015)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Methanol> (7.1.2015)

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrija> (22.1.2015)

<http://www.nutricionizam.com/index.php/prehrana-kod-bolesti/377-salicilati-intolerancija>
(26.2.2015)

<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/nd/SALICIN.htm> (25.2.2015)

<http://www.uomustansiriyah.edu.iq/008/phar/readpdf.php?id=5> (11.2.2015)

<http://diglib.tums.ac.ir/pub/magmng/pdf/5197.pdf> (15.1.2015)

Ignatowitz, E. (1996): Kemijska tehnika. 1. natis. Ljubljana: Jutro.

<http://www.farmedica.si/rastlina/44/Vrba> (9.2.2015)

<http://zdravplanet.blogspot.com/2008/11/bela-vrba-salix-alba.html> (10.2.2015)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16639491> (9.2.2015)

<http://www.naturalwellbeing.com/learning-center/Salicin> (25.2.2015)

<http://opensiuc.lib.siu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1559&context=eb1> (18.2.2015)

http://www.ivz.si/Mp.aspx?_5_PageIndex=0&_5_action=ShowNewsFull&_5_groupId=265&_5_id=2246&_5_newsCategory=&ni=132&pi=5&pl=132-5.0 (11.2.2015)

https://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.modrijan.si%2Fslv%2Fcontent%2Fdownload%2F3162%2F45928%2Fversion%2F1%2Ffile%2Fstr%2B34-39.pdf&ei=LSXNVO3JCszy7AaakIBo&usg=AFQjCNF00KJp4nbga93TdL_Y25i6wpYwtQ&sig2=gkMBqYF1Mb3l51jvAZTyiQ&bvm=bv.85076809,d.ZGU (6.10.2015)