



Šolski center Celje

Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

**EKSTRAKCIJA LIMONENA IZ STORŽEV IN SMOLE SMREKE,  
ANALIZA PRODUKTOV TER OPREDELITEV VPLIVA  
LUBADARJA NA VSEBNOST LIMONENA**

raziskovalna naloga

Avtor: Tomi Vavdi

Mentor: Mojca Drogenik Čerček, univ. dipl. inž. kem. teh.

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, marec 2016

## KAZALO VSEBINE

|  |           |
|--|-----------|
| ZAHVALA .....  | 6         |
| POVZETEK .....   | 7         |
| ABSTRACT .....   | 7         |
| <b>1 UVOD .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.1 Shema dela .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2 TEORETIČNE OSNOVE .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.1 Limonen .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.2 Smreka .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.3 Lubadar .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>2.4 Ekstrakcija .....</b>   | <b>12</b> |
| 2.4.1 Ekstrakcijska topila .....   | 13        |
| <b>2.5 Vakuumska filtracija .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2.6 Uparevanje z rotavaporjem .....</b>                                   | <b>16</b> |
| <b>2.7 Določanje suhe snovi .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.8 Tankoplastna kromatografija .....</b>                                 | <b>16</b> |
| <b>2.9 Plinska kromatografija .....</b>                                      | <b>17</b> |
| <b>3 PRAKTIČNI DEL .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>3.1 Priprava vzorca .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>3.2 Ekstrakcija .....</b>   | <b>18</b> |
| 3.2.1 Ekstrakcija s stresanjem .....   | 18        |
| 3.2.2 Navadna ekstrakcija .....  | 19        |
| <b>3.3 Vakuumska filtracija .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3.4 Uparevanje z rotavaporjem .....</b>                                   | <b>21</b> |
| <b>3.5 Določevanje suhe snovi .....</b>                                      | <b>23</b> |
| 3.5.1 Izračun deleža in mase suhe snovi ter izkoristka ekstrakcije .....     | 25        |
| <b>3.6 Tankoplastna kromatografija .....</b>                                 | <b>26</b> |
| 3.7.1. Kromatografija z nečistim limonenom .....                             | 26        |
| 3.7.2. Kromatografija s standardom in identifikacija kromatogramov .....     | 28        |
| <b>3.7 Priprava vzorcev za plinsko kromatografijo .....</b>                  | <b>30</b> |
| 3.8.1. Preizkus mešanja in topnosti .....                                    | 30        |
| 3.8.2. Poskusna ekstrakcija in kromatografija neshranjenih vzorcev .....     | 31        |
| 3.8.3. Ekstrakcija in kromatografija vzorcev, namenjenih za GC analizo ..... | 35        |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.9   | Plinska kromatografija .....                               | 37 |
| 4     | REZULTATI IN RAZPRAVA.....                                 | 39 |
| 4.1   | Ekstrakcija .....  | 39 |
| 4.2   | Tankoplastna kromatografija.....                           | 39 |
| 4.3   | Plinska kromatografija .....                               | 40 |
| 4.3.1 | Primerjava koncentracije limonena z vrsto ekstrakcije..... | 41 |
| 4.3.2 | Primerjava koncentracije limonena z vrsto topila.....      | 41 |
| 4.3.3 | Primerjava koncentracije limonena z vrsto vzorca .....     | 42 |
| 5     | ZAKLJUČEK .....  | 43 |
| 6     | PRILOGE .....  | 44 |
| 7     | LITERATURA .....   | 46 |

## KAZALO SLIK

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Slika 1:  | Strukturna formula limonena. ....  | 10 |
| Slika 2:  | Lubadar.....   | 12 |
| Slika 3:  | Rovi in ličinke lubadarja.....   | 12 |
| Slika 4:  | Molekula etanola.....  | 13 |
| Slika 5:  | Molekula acetona.....  | 14 |
| Slika 6:  | Molekula heksana.....  | 14 |
| Slika 7:  | Molekula diklorometana.....  | 15 |
| Slika 8:  | Zatehtanje vzorca smole brez vpliva lubadarja.....   | 19 |
| Slika 9:  | Stresanje ekstrakcijskih mešanic. ....   | 19 |
| Slika 10: | Mletje lusk storžev v kavnem mlinčku. ....   | 20 |
| Slika 11: | Filtracija pod znižanim tlakom.....  | 21 |
| Slika 12: | Ekstrakti ekstrakcije s stresanjem po filtriranju.....   | 21 |
| Slika 13: | Uparevanje z rotavaporjem.....   | 23 |
| Slika 14: | Ekstrakt po uparevanju z rotavaporjem.....   | 23 |
| Slika 15: | Zatehtanje izparilnice.....  | 26 |
| Slika 16: | Izparilnice po sušenju v eksikatorju.....  | 26 |
| Slika 17: | Priprava kromatografskih plošč.....  | 27 |
| Slika 18: | Potek kromatografije.....  | 27 |
| Slika 19: | Kemikalije in inventar, uporabljen pri pripravi mobilne faze.....                                | 27 |
| Slika 20: | Kromatogram št. 1 z nanešenim nečistim limonenom in vzorci.....                                  | 29 |
| Slika 21: | Kromatogram št. 1 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino KMnO <sub>4</sub> .....          | 29 |
| Slika 22: | Kromatogram št. 1 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm.....                    | 29 |
| Slika 23: | Kromatogrami št. 4, 5 in 6 z nanešenimi standardom in vzorci.....                                | 30 |
| Slika 24: | Kromatogrami št. 4, 5 in 6 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm.....           | 30 |
| Slika 25: | Kromatogrami št. 4, 5 in 6 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino KMnO <sub>4</sub> ..... | 30 |
| Slika 26: | Neshranjeni vzorci po stresanju s heksanom in vodo.....  | 33 |

|   |    |
|---|----|
| Slika 27: Kromatograma št. 7 in 8 z nanešenim standardom in heksanovimi fazami.....   | 34 |
| Slika 28: Kromatograma št. 7 in 8 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm.....                                       | 34 |
| Slika 29: Kromatograma št. 7 in 8 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 366 nm.....                                       | 34 |
| Slika 30: Kromatograma št. 7 in 8 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino KMnO <sub>4</sub> .....                             | 34 |
| Slika 31: Vzorci, namenjeni za GC analizo po stresanju s heksanom in vodo.....  | 36 |
| Slika 32: Kromatograma št. 9 in 10 z nanešenim standardom, nečistim limonenom in heksanovimi fazami. ....                           | 36 |
| Slika 33: Kromatograma št. 9 in 10 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm.....                                      | 36 |
| Slika 34: Kromatograma št. 9 in 10 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino KMnO <sub>4</sub> .....                            | 37 |
| Slika 35: Vzorci v vialah, pripravljeni za plinski kromatograf.....   | 37 |
| Slika 36: Graf, ki prikazuje izkoristke ekstrahiranj posameznih vzorcev pri dveh vrstah ekstrakcije s tremi različnimi topili. .... | 39 |
| Slika 37: Graf, ki prikazuje koncentracije limonena v posameznih vzorcih. ....  | 41 |
| Slika 38: Kromatogram plinske kromatografije vzorcev št. 1. ....  | 45 |
| Slika 39: Kromatogram plinske kromatografije vzorcev št. 2. ....  | 45 |

## KAZALO TABEL

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Inventar, uporabljen za ekstrakcijo s stresanjem. ....  | 18 |
| Tabela 2: Kemikalije, uporabljene za ekstrakcijo s stresanjem. ....   | 18 |
| Tabela 3: Zatehtane mase vzorcev v posameznih paralelkah pri ekstrakciji s stresanjem. ....   | 19 |
| Tabela 4: Inventar, uporabljen za navadno ekstrakcijo. ....   | 19 |
| Tabela 5: Kemikalije, uporabljene za navadno ekstrakcijo.....   | 20 |
| Tabela 6: Zatehtane mase vzorcev v posameznih paralelkah pri navadni ekstrakciji. ....  | 20 |
| Tabela 7: Inventar, uporabljen za vakuumsko filtracijo. ....  | 21 |
| Tabela 8: Inventar, uporabljen pri uparovanju z rotavaporjem. ....  | 22 |
| Tabela 9: Zatehtane mase bučk, mase bučk s koncentriranim ekstraktom in mase koncentriranega ekstrakta pri ekstrakciji s stresanjem. .... | 22 |
| Tabela 10: Zatehtane mase bučk, mase bučk s koncentriranim ekstraktom in mase koncentriranega ekstrakta pri navadni ekstrakciji. ....     | 23 |
| Tabela 11: Inventar, uporabljen pri določanju suhe snovi. ....  | 23 |
| Tabela 12: Povprečne mase izparilnic, ekstraktov za sušenje in izparilnic s sušino pri ekstrakciji s stresanjem. ....                     | 24 |
| Tabela 13: Delež suhe snovi, masa suhe snovi in izkoristek ekstrakcije pri vzorcih ekstrakcije s stresanjem. ....                         | 24 |
| Tabela 14: Povprečne mase izparilnic, ekstraktov za sušenje in izparilnic s sušino pri navadni ekstrakciji.....                           | 24 |
| Tabela 15: Delež suhe snovi, masa suhe snovi in izkoristek ekstrakcije pri vzorcih navadne ekstrakcije.....                               | 25 |
| Tabela 16: Inventar, uporabljen pri kromatografiji z nečistim limonenom.....  | 26 |
| Tabela 17: Kemikalije, uporabljene pri kromatografiji z nečistim limonenom.....   | 26 |
| Tabela 18: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 1.....  | 27 |
| Tabela 19: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 2.....  | 27 |
| Tabela 20: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 3.....  | 27 |

|   |    |
|---|----|
| Tabela 21: Inventar, uporabljen pri kromatografiji s standardom in identifikaciji kromatogramov. ....         | 28 |
| Tabela 22: Kemikalije, uporabljene pri kromatografiji s standardom in identifikaciji kromatogramov..          | 28 |
| Tabela 23: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 4.....  | 28 |
| Tabela 24: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 5.....  | 28 |
| Tabela 25: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 6.....  | 28 |
| Tabela 26: Inventar, uporabljen pri preizkusu mešanja in toposti.....   | 31 |
| Tabela 27: Kemikalije, uporabljene pri preizkusu mešanja in topnosti.....                                     | 31 |
| Tabela 28: Inventar, uporabljen pri poskusni ekstrakciji in kromatografiji neshranjenih vzorcev. ....         | 32 |
| Tabela 29: Kemikalije, uporabljene pri poskusni ekstrakciji in kromatografiji neshranjenih vzorcev. ...       | 32 |
| Tabela 30: Razporeditev vzorcev na kromatogramu št. 7.....  | 32 |
| Tabela 31: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 8.....  | 32 |
| Tabela 32: Inventar, uporabljen pri ekstrakciji in kromatografiji vzorcev, namennjenih za GC analizo.         | 35 |
| Tabela 33: Kemikalije, uporabljene pri ekstrakciji in kromatografiji vzorcev, namennjenih za GC analizo. .... | 35 |
| Tabela 34: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 9.....  | 35 |
| Tabela 35: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 10.....   | 35 |
| Tabela 36: Inventar, uporabljen pri pripravi vzorcev za plinsko kromatografijo.....                           | 37 |
| Tabela 37: Masne koncentracije limonena v posameznih vzorcih heksanovih faz. ....                             | 38 |
| Tabela 38: Prisotnost limonena v posameznih vzorcih pri ekstrakciji s stresanjem.....                         | 40 |
| Tabela 39: Prisotnost limonena v posameznih vzorcih pri navadni ekstrakciji. ....                             | 40 |
| Tabela 40: Povprečne koncentracije limonena v vzorcih, glede na vrsto ekstrakcije. ....                       | 41 |
| Tabela 41: Povprečne koncentracije limonena v vzorcih glede na vrsto ekstrakcijskega topila. ....             | 41 |
| Tabela 42: Povprečne koncentracije limonena v vzorcih glede na njihovo vrsto.....                             | 42 |
| Tabela 43: Mase izparilnic, ekstraktov za sušenje in izparilnic s sušino. ....                                | 44 |

## ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorici prof. Mojci Drofenik Čerček za vso pomoč in nasvete, s katerimi sem uspešno izvedel zastavljeno nalogo. Za vse nasvete se zahvaljujem tudi prof. Ireni Drofenik.

Zahvaljujem se tudi obema laborantkama, Sabini Litera in Aleksandri Mlakar za moralno in tehnično podporo pri izvedbi raziskovalne naloge.

Zahvaljujem se teti Mariji Visočnik, njenemu možu Francu in hčerki Mateji za pomoč pri vzorčevanju.

Zahvaljujem se g. dr. Iztoku Jožetu Koširju, g. Mihi Ocvirku in Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, ker so mi dovolili in pomagali pri analizi analizo vzorcev heksanovih faz s plinskim kromatografom, da sem lahko določil koncentracije limonena.

Zahvala velja tudi mag. Andreji Tkalec, prof. in prof. Klavdiji Špur Jereb za lektorstvo in ne nazadnje Šolskemu centru Celje za možnost izvedbe praktičnega dela.

## POVZETEK

Raziskovalna naloga zajema preučevanje vpliva prisotnosti lubadarja na vsebnost limonena v storžih in smoli smreke. Raziskovani so trije vzorci, in sicer: vzorec storžev smreke, vzorec smole smreke, ki je bila napadena z lubadarjem, in vzorec smole smreke, ki je lubadar ni napadel. Limonen je iz vzorcev ekstrahiran s tremi različnimi topili: etanolom, acetonom in heksanom ter z dvema postopkoma ekstrakcije, in sicer z navadno ekstrakcijo ter ekstrakcijo s stresanjem. Ugotovljeno je bilo, da je heksan kot topilo najboljša izbira za ekstrakcijo limonena, ekstrakcija s stresanjem pa najučinkovitejša. Analiza vzorcev ekstraktov je bila izvedena s tankoplastno in plinsko kromatografijo. Pokazalo se je, da je v vzorcih smole smreke, napadene z lubadarjem, več limonena.

Ključne besede: limonen, lubadar, smola smreke, ekstrakcija, kromatografija.

## ABSTRACT

Research paper is about the impact of the presence of the bark beetle on the content of limonene in pines and resin of the spruce. There were three samples included in the research: sample of pines of spruce, sample of resin of spruce that was attacked with bark beetle and unattacked sample of resin of spruce. Limonene was extracted from samples with three different solvents: ethanol, acetone and hexane and with two procedure of extraction, namely with normal extraction and extraction with shaking. It was found out that hexane, being a solvent is the best choice for extraction of limonene, and extraction with shaking was more efficient. Analysis of samples was made with thin layer chromatography and gas chromatography. The research showed that in attacked samples of resin of spruce with bark beetle there is more limonene.

Key words: limonene, bark beetle, resin of spruce, extraction, chromatography.

## 1 UVOD

Limonen je ciklični ogljikovodik, ki ga uvrščamo med terpene in ga zaradi njegovega prijetnega vonja po limoni uporabljamo v parfumi in čistilih, uporaben pa je tudi v zdravstvu. Ker je naraven insekticid, ga smreke v svoji smoli izkoriščajo za obrambo pred lubadarjem.

V tej raziskovalni nalogi je namen ugotoviti koncentracijo limonena v storžih in v dveh vzorcih smol smreke. Prvi vzorec je nabran iz smrek, ki so bile zdrave, brez vpliva lubadarja, drugi pa je pridobljen iz smrek, ki so bile že napadene z lubadarjem. Ugotoviti želimo tudi, katero izmed treh topil je najprimernejše za ekstrakcijo limonena iz omenjenih vzorcev in ali je koncentracija limonena res večja pri smoli smreke, napadene z lubadarjem, kakor navajajo ugotovitve iz virov drugih avtorjev: »*Povečano prisotnost limonena v smoli je zaznati na območjih, kjer je več lubadarja.*«<sup>1</sup> in »*Večji delež limonena je tako v smoli zaznati na področjih, kjer je bolj razmnožen lubadar.*«<sup>2</sup>

Medtem primerjamo tudi dve vrsti ekstrakcije: s stresanjem in brez nje.

Na osnovi podatkov, ki smo jih pridobili iz literature, lahko postavimo dve hipotezi:

1. Koncentracija limonena bo večja v vzorcih smole smreke, ki je bila napadena z lubadarjem.

Smreka se zaščiti pred napadom lubadarja tako, da v smoli poviša koncentracijo limonena, ki je naravni insekticid.

2. Koncentracija limonena bo največja pri ekstrakciji s heksanom.

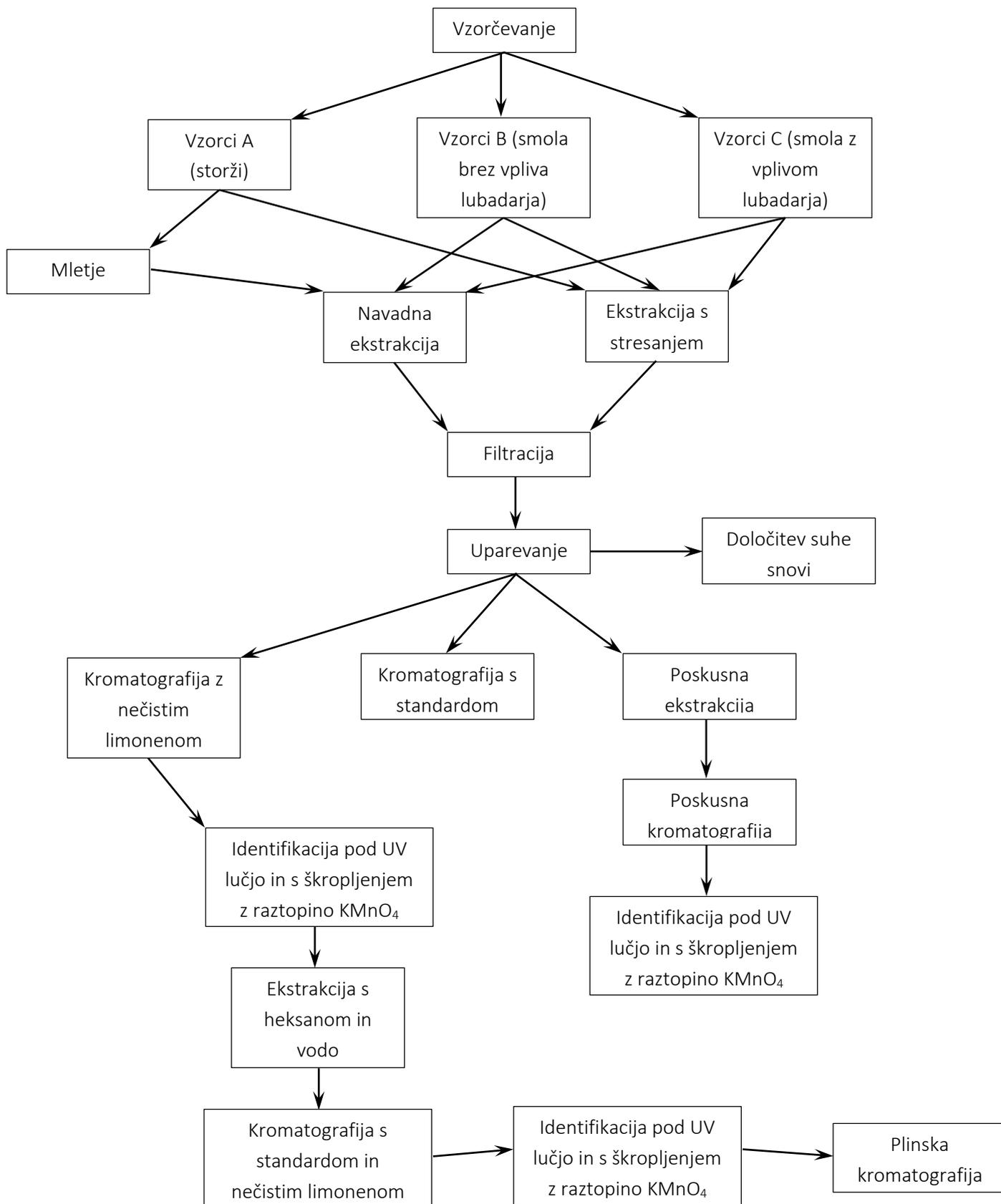
Zaradi napolarnosti heksana in napolarnosti limonena sklepamo, da se bo limonen najbolj topil pri ekstrakciji s heksanom, ker sta ostali dve topili manj napolarni kot heksan.

---

<sup>1</sup> Vir: <http://www.saljic.si/sestavine/limonene>

<sup>2</sup> Vir: <http://hr.smrekovit.com/en/blog/8-blog/6-limonen>

## 1.1 Shema dela



## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Limonen

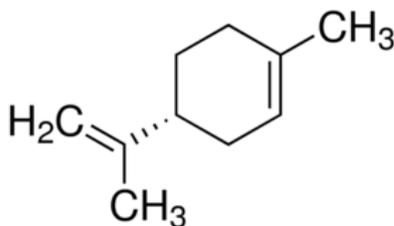
Limonen oz. 1-metil-4-(1-metiletenil)-cikloheksen je ogljikovodik, ki je pri sobni temperaturi v tekočem stanju in brez barve. Uvrščamo ga med ciklične terpene z enim obročem. Ime jo dobil zaradi precejšnje vsebnosti v lupini limone in lupinah drugih citrusov, kar jim daje tudi značilen vonj. Najpogostejši je D – limonen, ki je enantiomer, ima močan vonj pomaranče in ga pridobivamo iz lupine citrusov s centrifugiranjem in parno destilacijo. Limonen pa lahko najdemo tudi v smoli iglavcev. Ta služi drevju kot zaščita pred žuželkami, večje koncentracije pa zaznamo na območju, kjer je prisoten lubadar.

Gostota limonena je manjša od gostote vode in sicer znaša 0,8411 g/mL, vrelišče limonena pa je pri 176 °C. V vodi je zaradi nepolarosti molekule netopen, topen pa je v organskih topilih, kot so tetraklorometan, kloroform, heksan in ogljikov disulfid.

Je relativno stabilen terpen in ga lahko destiliramo, ne da bi pri tem razpadel, pri visokih temperaturah pa kljub temu razpade in tvori izopren. V vlažnem okolju oksidira in tvori karveol, karvon in limonen oksid, dehidrogenizira pa s pomočjo žveplove kisline v p-cimen.

Uporablja se kot dišava v parfumi in čistilih ter razkužilih. Znan je kot naravni insekticid, uporabljamo pa ga tudi za nadomestek terpentina. Zaradi vnetljivosti je obranavan kot biogorivo, topi polistiren, zato lahko nadomešča aceton. Pri pripravi tkiv za histološke preiskave ga uporabljamo kot nadomestek ksilena. V zdravstvu se uporablja kot zdravilo proti gastroezofagealni refluksni bolezni in zgagi.

(Povzeto po: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Limonen>, 30. 12. 2015)



Slika 1: Strukturna formula limonena.

(Vir: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure5/183/mfcd00062991.eps/\\_jcr\\_content/renditions/mfcd00062991-medium.png](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure5/183/mfcd00062991.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00062991-medium.png), 22. 2. 2016)

### 2.2 Smreka

Smreka (znanst. *Picea*) izhaja iz družine borovk, družina pa šteje okoli 35 vednozelenih vrst iglavcev. Njen les je po celotnem deblu svetlo rumenkaste barve. Obdelan les ima vonj po smoli, v lesu pa najdemo tudi smolne žepke.

Je iglavec, ki zelo hitro raste, krošnja je iz ukrivljenih vej. Igllice dolžine od 10 do 25 milimetrov so ravne, na koncu vej pa raste socvetje, imenovano storž, ki je podolgovate oblike in visi z vej navzdol. Smreka doseže maksimalno višino od 20 do 30 metrov, v obseg pa meri največ od 5 do 7 metrov.

Lubje je zelo hrapavo, rdečkastorjave barve in smolnato. Njene korenine ne rastejo globoko v zemljo, ampak so plitvo pod površjem. Semena so krilata, ker je smreka golosemenka, se razmnožuje s pomočjo vetra.

Semena, ki so v začetku rasti storžev zaprta v njih, ti pa so zelene barve in zelo trdo zbiti skupaj, se ob dozorevanju jeseni razprejo in porjavijo, potem pa jih odnese veter.

Smrekovi vršički vsebujejo precej smole, ki nastane iz balzama, iz katerega je izhlapelo eterično olje. Ostane politerpenska zmes, v kateri so smolne kisline, alkoholi in druge spojine. Poleg teh spojin vsebujejo smrekovi vršički tudi hlapljivo olje, vitamin C, pinen, limonen, bornilni acetat ...

Nekatere od smrek so zelo redke in se pojavljajo samo na določenih krajih po svetu.

(Povzeto po: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Smreka>, 30. 12. 2015)

### 2.3 Lubadar

Lubadar, zalubnik oz. zavrtač (*Scolytinae*) spada v družino pravih rilčkarjev. Lubadarji so slovensko ime dobili po vrtanju pod lubjem dreves, s čimer drevo uničijo, posamezne vrste pa lahko prepoznamo tudi po njihovi značilni razpredeni obliki rovov.

Po izgledu so majhni hroščki valjaste oblike, temne barve zunanjega skeleta in velikosti največ do 5 milimetrov. Ker spadajo v družino rilčkarjev, imajo značilni rilček, ki je sicer zelo kratek, glava pa je skrita pod ščitom oprsja. Po lesu lahko vrtajo z ostrim grizalom, v katerega so izoblikovane njihove obustne okončine. Imajo tudi kolenčaste tipalnice in štiričlenkaste noge. Pokrovke jim, ker so ukrivljene nazaj, služijo kot lopate, z njimi pa lahko odstranjujejo odpadni in navrtani material iz rovov.

Veliko vrst proizvaja zvoke s stridulacijo, tj. drgnjenje telesnih delov med seboj. S takšnimi zvoki se lahko najde tudi dva spolna partnerja. Njihovo dvorjenje poteka na način, da samec samici najprej izdolbe »poročno« kamrico. V njej se nato sparita, samica pa po tistem odleže jajčeca. Ličinke so, ko se izležejo, črvaste oblike, blede barve in nimajo nog. Ko dozori, se zabubijo v lesu, ko odrastejo, pa se skozi lubje pregrizejo na površje.

Večina lubadarjev se prehranjuje z odmrlim oz. odmirajočim lesom (floem). Napadajo predvsem poškodovana drevesa, prizadeta od bolezni, vremenskih vplivov (suša, žled, smog, ...) in fizičnih poškodb, zato v zdravih gozdovih ne povzročajo težav. Poznamo pa tudi takšne vrste lubadarjev, ki napadejo zdrava drevesa in lahko povzročijo propad celotnega gozda.

Zdrava drevesa se sama zaščitijo s fizično in kemično zaščito (smolo), vseeno pa lahko podležejo lubadarju, kadar je njegova številčnost prevelika, poleg tega pa ga privlači tudi etanol, ki nastaja ob razpadu lesa. Ker se lubadar lahko naseli tudi v posekanem lesu, to preprečijo tako, da hlodom olupijo skorjo.

V Sloveniji je med najbolj znanimi smrekov lubadar (*Ips typographus*), poleg njega pa poznamo tudi druge pomembnejše vrste, kot so:

- črni zaubnik (*Hylastes ater*),
- brestov lesovrt (*Scolytus scolytus*),
- bakreni lubadar (*Pityogenes calcographus*),
- šesterezobi lubadar (*Ips sexdentatus*).

V Sloveniji poznamo 88 vrst lubadarjev. Največjo škodo so lubadarji doslej povzročili leta 2004, ko so morali zaradi njih posekati preko 573.000 m<sup>3</sup> lesa.

(Povzeto po: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Zalubniki>, 2. 1. 2016)



Slika 2: Lubadar.

(Vir:

<http://www.zirovnica.si/UserFiles/1482/Image/lubadar%202.jpg>, 22. 2. 2016)



Slika 3: Rovi in ličinke lubadarja.

(Vir:

[http://www.mojaobcina.si/img/1/H\\_MAX\\_1024x768/iknaver-zalegabube.jpg](http://www.mojaobcina.si/img/1/H_MAX_1024x768/iknaver-zalegabube.jpg), 22. 2. 2016)

## 2.4 Ekstrakcija

Je metoda, s katero izločamo komponente iz trdne snovi oz. tekoče faze v drugo tekočo fazo s pomočjo topila. Ekstrakcija trdno – tekoče temelji na topnosti spojin v ekstrakcijskem topilu, ekstrakcija tekoče – tekoče pa na osnovi topnosti spojine v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata. Ekstrakcijo tekoče – tekoče uporabljamo, kadar ni mogoča destilacija oz. rektifikacija zaradi premajhne razlike v temperaturah vrelišča, tvorbe azeotropnih snovi in pri ločevanju temperaturno neobstoje snovi (vitamini, antibiotiki, aromatske snovi, ...).

Navadna ekstrakcija oz. maceracija poteka v treh stopnjah:

1. Mešanje topila in snovi, ki jo ekstrahiramo; zmes pustimo v stiku dalj časa.
2. Mehansko ločevanje ekstrakta in izluženega ekstrakcijskega ostanka (s centrifugiranjem, filtracijo).
3. Termična ločitev ekstraktne faze v ekstrakt in topilo (z uparjanjem).

Pri ekstrakciji je zelo pomembna pravilna izbira topila, lahko pa vplivamo tudi na hitrost ekstrakcije:

- z razliko v koncentraciji - pri večji razliki je ekstrakcija učinkovitejša;
- z ekstrakcijsko površino, ki jo lahko povečamo z drobljenjem - bolj zdrobljena je snov, večja je površina snovi, boljša je ekstrakcija;
- s temperaturo - višja je temperatura, boljša je ekstrakcija, vendar je potrebno paziti, da ne dosežemo vrelišča topila oziroma da ne povzročimo razkroja termično nestabilnih spojin.

Za dobro ločitev faz po ekstrakciji je pomembna razlika v gostotah osnovnega in ekstrakcijskega topila in netopnosti enega v drugem. Uspešnost ekstrakcije ugotovimo iz izračuna suhe snovi ali pa iz porazdelitvenega koeficienta  $k$ . Nernstov porazdelitveni koeficient  $k$  je razmerje ravnotežnih koncentracij komponente v topilu 1 in v topilu 2.

$$\frac{c_1}{c_2} = k$$

Čim večji je  $k$ , tem uspešnejša je ekstrakcija.

### 2.4.1 Ekstrakcijska topila

Kot je bilo že omenjeno, je izbira topila pri ekstrakciji zelo pomembna, saj pripomore k učinkovitosti ekstrakcije, pomembno pa je tudi, da topilo pravilno izberemo. Na izbiro vplivajo naslednje lastnosti topila:

- selektivnost - topilo mora topiti samo snov, ki jo želimo ekstrahirati;
- kemijska inertnost, saj topilo ne sme reagirati z raztopljeno snovjo;
- obnašanje ob vrelišču, ker lahko, če je temperatura previsoka, topilo zavre oz. začne razpadati; pomembna je tudi regeneracija topila, to pomeni, da lahko po ekstrakciji topilo ponovno uporabimo.
- na izbiro topila vplivata tudi njegova cena in toksičnost.

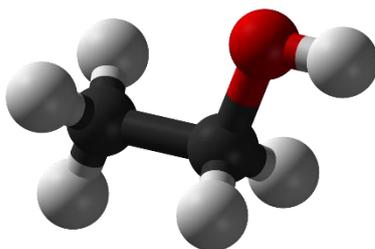
(Povzeto po: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Ekstrakcija>, 15. 1. 2016, Ignatowitz, E. Kemijska tehnika. Ljubljana: Jutro, 1996)

#### 2.4.1.1 Etanol

Etanol oz. etilni alkohol je kisikova organska spojina. Prištevamo ga med alkohole, molekulska formula etanola je  $C_2H_5OH$ . Pri sobni temperaturi je v tekočem agregatnem stanju. Vsebujejo ga alkoholne pijače, v velikih količinah in visokih koncentracijah pa je strupen. Pri ljudeh povzroča ugodne psihofizične vplive, ki so kratkotrajni, dolgoročno uživanje pa privede do zasvojenosti.

Uporaben je kot razkužilo, topilo in gorivo. Ima manjšo gostoto kot voda: 0,79 g/mL pri 20 °C, njegovo vrelišče pa je pri normalnem zračnem tlaku 101,31 kPa pri 78 °C.

(Povzeto po: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Etanol>, 15. 1. 2016)



Slika 4: Molekula etanola.

(Vir:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b0/Ethanol-3D-balls.png>, 22. 2. 2016)

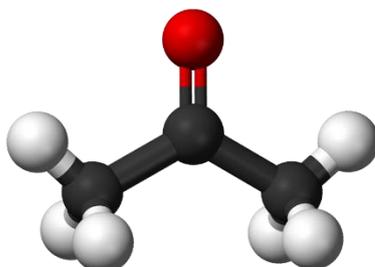
#### 2.4.1.2 Aceton

Aceton oz. propanon je najpreprostejši izmed ketonov s kemijsko formulo  $C_3H_6O$ . Je brezbarvna hlapljiva tekočina, z nizkim vnetiščem, ima skoraj enako gostoto kot etanol: 0,79 g/mL, njegovo vrelišče pa je nižje kot vrelišče etanola, saj zavre pri 56 °C. Z vodo in skoraj vsemi organskimi topili se meša, zato je pomembno laboratorijsko in industrijsko topilo.

V industriji se največ porablja pri proizvodnji polimerov, barvnih premazov in razstreliv. V domači uporabi se največkrat pojavi kot odstranjevalec laka za nohte.

Nahaja se tudi v praženi kavi in lanu, sicer v majhnih količinah, nastaja pa z razpadom linamarina in ga najdemo tudi v tobaku. V majhnih količinah nastaja tudi v človeškem telesu iz aminokislin, maščob in ogljikovih hidratov.

(Povzeto po: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Aceton>, 16. 1. 2016)



*Slika 5: Molekula acetona.*

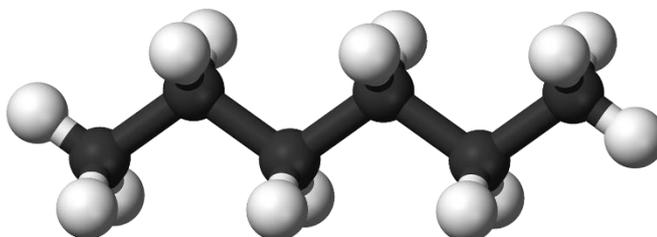
(Vir: [https://lh5.googleusercontent.com/-xXg637Z5VoU/TWgl\\_ewlTHI/AAAAAAAAAY/zooVOvixZsO/s1600/Acetone-3D-balls-B.png](https://lh5.googleusercontent.com/-xXg637Z5VoU/TWgl_ewlTHI/AAAAAAAAAY/zooVOvixZsO/s1600/Acetone-3D-balls-B.png), 22. 2. 2016)

#### 2.4.1.3 Heksan

Heksan je ogljikovodik z molekulsko formulo  $C_6H_{14}$  in je pri sobni temperaturi brezbarvna tekočina, brez vonja, s temperaturo vrelišča  $68,7\text{ }^{\circ}C$  (podatek velja za *n*-heksan). Njegova gostota znaša  $0,66\text{ g/mL}$ . Tako heksan kot vsi njegovi izomeri so pomembne sestavine bencina in se pogosto uporabljajo kot poceni, relativno varna, reaktivna in enostavno uparljiva nepolarna topila. Pridobiva se predvsem z rafiniranjem iz surove nafte.

V industriji se uporablja pri pripravi lepil za čevlje, pri proizvodnji jedilnega olja (repično, sojino olje) iz semen, za čiščenje in razmaščevanje. Laboratorijska uporaba heksana je precej obširna, uporablja se kot ekstrakcijsko sredstvo za oljne in mastne kontaminante voda in prsti za analize. Uporablja se pri reakcijah z zelo močnimi bazami, kot je priprava organolitijevega reagenta. V kromatografskih metodah se heksan uporablja kot nepolarno topilo, v farmaciji pa se njegova uporaba opušča zaradi dolgotrajne toksičnosti in tvorjenja metabolizmu strupenega heksan-2,5-diona.

(Povzeto po: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hexane>, 16. 1. 2016)



*Slika 6: Molekula heksana.*

(Vir: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Hexane-3D-balls-B.png>, 22. 2. 2016)

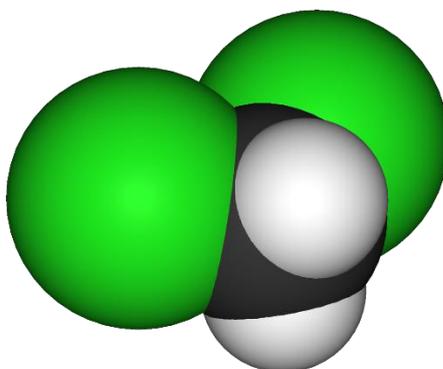
#### 2.4.1.4 Diklorometan

Diklorometan je halogeniran ogljikovodik z molekulsko formulo  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Je brezbarvna in hlapljiva tekočina in ima zmerno sladko aromo. Njegovo vrelišče je dokaj nizko, saj zavre že pri  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , gostota znaša  $1,33\text{ g/mL}$  pri  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Pogosto se uporablja kot topilo, kljub temu da se ne meša z vodo, se pa meša z mnogimi organskimi topili. V naravi se nahaja v oceanih, makroalgah, mokriščih in vulkanih, večina diklorometana pa je v okolju zaradi industrijskih emisij.

Pridobiva se z obdelavo klorometana ali metana s klorom v plinastem stanju pri  $400 - 500\text{ }^\circ\text{C}$ . Produkti pri reakciji so klorometan, diklorometan, kloroform in ogljikov tetraklorid, ki jih nato ločijo z destilacijo.

Je zelo uporabno organsko topilo, uporablja se kot odstranjevalec barv, razmaščevalec, kot potisni plin aerosolnih sprejev, penilo za poliuretanske pene, kot varilo nekaterih vrst plastike, za tesnenje ohišja električnih števecv, največkrat je glavna sestavina plastičnih varilnih lepil. V živilski industriji se uporablja za dekofeinizacijo kave in čaja ter pripravo izvlečkov hmelja in drugih arom.

(Povzeto po: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dichloromethane>, 30. 1. 2016)



Slika 7: Molekula diklorometana.

(Vir:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/00/Dichloromethane-3D-vdW.png>, 23. 2. 2016)

## 2.5 Vakuumska filtracija

Filtracija je običajen mehanski postopek, uporabljen za ločevanje trdnih snovi od tekočin oz. plinov. Suspendirana trdna snov prehaja skozi medij oz. filter, ki je za trdno snov nepropusten. Velikost delcev, ki jih filter zadrži, je odvisna od velikosti por filtra. Poznamo več vrst filtracije:

- vroča filtracija,
- hladna filtracija,
- vakuumska filtracija.

Vakuumska filtracija je najbolj primerna za majhne količine suspenzij in je hitrejša kot ostali dve metodi. Zanj uporabljamo presesalno bučo, ki ima nastavek za cev vakuumske črpalke in je narejena iz debelejših stene, da prenese visok podtlak.

Nanjo namestimo poseben keramičen Büchnerjev lij, vanj pa vstavimo filter papir s premerom lija. Vakuumsko črpalko, ki je povezana na presesalno bučo, namestimo na pipo.

(Povzeto po: <https://en.wikipedia.org/wiki/Filtration>, 30. 1. 2016)

## 2.6 Uparevanje z rotavaporjem

Uparevanje z rotavaporjem oz. uparevanje pod znižanim tlakom je postopek koncentriranja oz. izganjanja topila iz raztopine. Topilo izganjamo s pomočjo vodne kopeli in vakuumske črpalke. Bučko z raztopino potopimo v vodno kopel, ki je segreta do največ 80 °C, tlak v bučki pa znižamo in tako raztopina oz. topilo zavre pri nižji temperaturi, to topilo pa nato kondenzira na poti skozi hladilnik v lovilno bučko.

## 2.7 Določanje suhe snovi

Suho snov v ekstraktu določamo zato, da lahko izračunamo izkoristek ekstrakcije. Suha snov je snov, ki ostane po popolni odstranitvi topila.

## 2.8 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastna kromatografija ali Thin Layer Chromatography (TLC) je ena izmed kromatografskih tehnik, ki se uporablja za ločevanje zmesi. Izvaja se na plošči iz stekla, plastike ali aluminija, ki je prekrita s tanko plastjo absorpcijskega materiala. Absorpcijski material je ponavadi silikatni gel, aluminijev oksid ali celuloza, takšna plast se imenuje stacionarna faza. Za mobilno fazo uporabljamo eno topilo ali mešanico organskih topil, ki topijo preiskovano snov. S TLC kromatografijo določamo, katere snovi so v vzorcu, tako da poleg vzorca na kromatogram naneseemo tudi standard in primerjamo lise komponent in standarda oziroma njihove retencijske faktorje. Retencijski faktor je razmerje med potjo lise in potjo topila:

$$R_f = \frac{d_l}{d_t}$$

Ugotavljamo lahko tudi količino teh snovi, vendar za to večinoma uporabljamo druge metode. Vzorec naneseemo na kromatografsko ploščo, ki ga nato mobilna faza ponese po stacionarni fazi in se zaradi različne topnosti loči na komponente. Ponavadi so nekatere snovi brezbarvne in jih zato identificiramo na različne načine:

- pod UV lučjo,
- s potapljanjem ali škropljenjem s specifičnimi barvnimi reagenti, npr. z raztopino  $\text{KMnO}_4$ ,
- z jodovimi izparinami,
- s fluorescenčnimi spojinami, ki so dodane že adsorbcijski plasti, npr. cinkov silikat, aktiviran z manganom.

(Povzeto po: [https://sl.wikipedia.org/wiki/Tankoplastna\\_kromatografija](https://sl.wikipedia.org/wiki/Tankoplastna_kromatografija), 30. 1. 2016)

## 2.9 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija ali Gas Chromatography (GC) je po principu podobna tankoplastni, le da je pri tej metodi mobilna faza nek inerten plin, npr. helij, dušik, argon ali drugi žlahtni plini. Stacionarna faza je vedno kolona, zaprta ali kapilarna. Zaprte kolone so pogoste in cenejše za uporabo in dajo ustrezne rezultate, medtem ko so kapilarne kolone vse bolj pogosto uporabljene in načeloma dajejo boljšo resolucijo, a so dražje.

Oba tipa kolon sta narejena iz neadsorbatnih in inertnih materialov, najbolj pogosto so uporabljeni nerjaveče jeklo, steklo in kristalni oz. taljeni kremen. Stacionarna faza je največkrat adherirana z materialom iz tekočega silikona na notranjost cevi z majhnim premerom.

Vzorec, ponavadi le nekaj mikrolitrov, vnesemo v injektor, nosilni plin pa ga nato ponese skozi stacionarno fazo, kjer se zaradi različne vezave na stacionarno fazo komponente ločujejo. Na koncu kolone je detektor, ki pretvori intenziteto v odvisnosti od retenzijskega časa snovi v signal oz. pik, ta pa se izriše na grafu. Količino snovi določujemo s površino pika, ki jo izračunamo z integriranjem.

(Povzeto po: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Kromatografija>, 30. 1. 2016)

## 3 PRAKTIČNI DEL

### 3.1 Priprava vzorca

Vzorci smole in storžev po nabiranju shranimo v zamrzovalniku, pred delom pa storže posušimo v sušilniku in luske pri maceraciji zmeljemo v kavnem mlinčku, pri ekstrakciji s stresanjem pa ne.

### 3.2 Ekstrakcija

#### 3.2.1 Ekstrakcija s stresanjem

Za ekstrakcijo s stresanjem uporabljamo inventar, naveden v tabeli 1, in kemikalije, navedene v tabeli 2.

Tabela 1: Inventar, uporabljen za ekstrakcijo s stresanjem.

| Količina: | Inventar:            |
|-----------|----------------------|
| 1 x       | stresalnik           |
| 9 x       | jodirka, 250 mL      |
| 9 x       | zamašek za jodirko   |
| 1 x       | merilni valj, 100 mL |
| 1 x       | čaša, 150 mL         |
| 1 x       | precizna tehtnica    |
| 1 x       | lij                  |

Tabela 2: Kemikalije, uporabljene za ekstrakcijo s stresanjem.

| Količina: | Kemikalija:  |
|-----------|--|
| 450 mL    | etanol, $\geq 98\%$<br>   |
| 450 mL    | aceton, $\geq 99,5\%$<br> |
| 450 mL    | heksan, $\geq 95\%$<br>   |

Najprej v tri jodirke zatehtamo določeno maso lusk storžev (v nadaljevanju A), v tri določeno maso smole brez vpliva lubadarja (v nadaljevanju B) in v tri določeno maso smole z vplivom lubadarja (v nadaljevanju C). Nato na vsako paralelko nalijemo tri vrste topil po 150 mL: etanol (v nadaljevanju 1), aceton (v nadaljevanju 2) in heksan (v nadaljevanju 3). Jodirke postavimo na stresalnik in jih pritrdimo z vodili ter stresalnik nastavimo na 60 minut pri 250 obratih na minuto. V tabeli 3 so zbrane mase zatehtanih vzorcev.

Tabela 3: Zatehtane mase vzorcev v posameznih paralelkah pri ekstrakciji s stresanjem.

| Paralelka: | Masa vzorca: |
|------------|--------------|
| A1         | 20,04 g      |
| A2         | 20,13 g      |
| A3         | 20,02 g      |
| B1         | 20,10 g      |
| B2         | 20,14 g      |
| B3         | 20,16 g      |
| C1         | 20,12 g      |
| C2         | 20,05 g      |
| C3         | 20,04 g      |



Slika 8: Zatehtanje vzorca smole brez vpliva lubadarja. (Lasten vir)



Slika 9: Stresanje ekstrakcijskih mešanic. (Lasten vir)

### 3.2.2 Navadna ekstrakcija

Za navadno ekstrakcijo uporabljamo inventar, naveden v tabeli 4, in kemikalije, navedene v tabeli 5:

Tabela 4: Inventar, uporabljen za navadno ekstrakcijo.

| Količina: | Inventar:             |
|-----------|-----------------------|
| 9 x       | jodirka, 250 mL       |
| 9 x       | zamašek za jodirko    |
| 1 x       | merilni valj, 100 mL  |
| 1 x       | čaša, 150 mL          |
| 1 x       | precizna tehtnica     |
| 1 x       | mlinček za kavo Iskra |
| 1 x       | lij za suhe snovi     |
| 1 x       | žlička                |



Slika 10: Mletje lusk storžev v kavnem mlinčku. (Lasten vir)

Tabela 5: Kemikalije, uporabljene za navadno ekstrakcijo.

| Količina: | Kemikalija:          |
|-----------|----------------------|
| 450 mL    | etanol, ≥ 98 %<br>   |
| 450 mL    | aceton, ≥ 99,5 %<br> |
| 450 mL    | heksan, ≥ 95 %<br>   |

Za navadno ekstrakcijo enako kot pri ekstrakciji s stresanjem v jodirke zatehtamo določeno količino vzorcev A, B in C, le da pri prvem vzorcu, torej pri luskah storžev, ekstrakcijsko površino povečamo tako, da storže zmeljemo v kavnem mlinčku. Enako nato na vsako paralelko nalijemo po 150 mL ekstrakcijskih topil 1, 2 in 3. Ekstrakcijsko mešanico nato pustimo stati 14 dni. Mase vzorcev so prikazane v tabeli 6.

Tabela 6: Zatehtane mase vzorcev v posameznih paralelkah pri navadni ekstrakciji.

| Paralelka:       | Masa vzorca: |
|------------------|--------------|
| A1* <sup>3</sup> | 20,30 g      |
| A2*              | 20,20 g      |
| A3*              | 20,00 g      |
| B1*              | 20,49 g      |
| B2*              | 20,10 g      |
| B3*              | 20,05 g      |
| C1*              | 20,04 g      |
| C2*              | 20,18 g      |
| C3*              | 20,15 g      |

<sup>3</sup> Vzorci označeni z zvezdico so ekstrahirani s postopkom navadne ekstrakcije.



Slika 11: Filtracija pod znižanim tlakom. (Lasten vir)



Slika 12: Ekstrakti ekstrakcije s stresanjem po filtriranju. (Lasten vir)

### 3.3 Vakuumska filtracija

Vseh 18 vzorcev po končani ekstrakciji filtriramo pod znižanim tlakom, uporabljamo inventar, naveden v tabeli 7.

Tabela 7: Inventar, uporabljen za vakuumsko filtracijo.

| Količina: | Inventar:       |
|-----------|-----------------|
| 1 x       | presesalna buča |
| 1 x       | nuča            |
| 1 x       | filtrirni papir |
| 1 x       | škarje          |
| 1 x       | šestilo         |
| 1 x       | vodna črpalka   |
| 1 x       | lij             |
| 1 x       | pinceta         |

Predhodno izrežemo 18 okroglih filtrirnih papirjev. Nato na presesalno bučo nataknemo cev vodne črpalke, jo vklopimo in vsak vzorec prenučiramo po dvakrat. Kjer je ostalo v filtratu še kaj tropin, prefiltriramo še tretjič, tropine pa zavržemo. Filtrate shranimo v jodirkah, ki jih prej uporabimo za ekstrakcijo. Filtrirno bučo je potrebno vedno očistiti z topilom, s katerim je bil vzorec, ki ga predhodno filtriramo, ekstrahiran, ker se, ko bučo spiramo s topilom, ustvari motna bela tekočina.

### 3.4 Uparevanje z rotavaporjem

Vse filtrate, ki jih shranimo, nato uparimo s pomočjo rotavaporja. Za delo z rotavaporjem uporabljamo inventar, naveden v tabeli 8.

Tabela 8: Inventar, uporabljen pri uparevanju z rotavaporjem.

| Količina: | Inventar:                  |
|-----------|----------------------------|
| 1 x       | rotavapor                  |
| 4 x       | bučka za rotavapor, 500 mL |
| 1 x       | lovilna bučka, 1000 mL     |
| 1 x       | lij                        |
| /         | silikonska mast            |
| 1 x       | precizna tehtnica          |
| 1 x       | laboratorijsko stojalo     |
| 1 x       | termometer, -10°C – 150°C  |
| 1 x       | filtrirni obroč            |
| 1 x       | vodna črpalka              |
| 2 x       | stišček                    |
| 5 x       | stojalo za bučko           |

Filtrat prelijemo v bučko za rotavapor, predhodno pa prazno bučko stehtamo. Obrus bučke in rotavaporskega nastavka namažemo s silikonsko mastjo, da lahko bučko po končani ekstrakciji snamemo, nato pa na rotavapor, v katerem je že segreti vodna kopel, katere temperaturo nadzorujemo s termometrom, ki je pritrjen na filtrirni obroč, natakemo bučko z ekstraktom in jo pritrdimo s stiščkom. Tudi na izliv hladilnika natakemo lovilno bučko in jo prav tako pritrdimo s stiščkom, pod njo pa za primer da bučka pade, postavimo stojalo za bučko.

Odpremo vodo za hladilnik in bučko potopimo v kopel, tako da se ne dotika roba posode. Vključimo vrtenje, odpremo vakuumsko črpalko in zapremo ventil za dovod zraka. Če začne ekstrakt vreti in kipeti, vakuum popustimo, sicer ekstrakt potegne čez hladilnik. Ko odpari približno dve tretjini topila oz. ko ostane malo koncentriranega ekstrakta (do suhega ne smemo upareti), odpremo vakuum, zapremo vakuumsko črpalko, ugasnemo vrtenje in bučko dvignemo iz kopeli. Malo počakamo, da vakuum popusti in bučko snamemo, jo obrišemo ter bučko skupaj s koncentriranim ekstraktom stehtamo. Koncentriran ekstrakt nato shranimo v epruvetah. Enako ponovimo še z vsemi 17 vzorci. Iz mas bučke ter bučke in koncentriranega ekstrakta izračunamo maso koncentriranega ekstrakta. Tabeli 9 in 10 prikazujeta mase bučk, bučk s koncentriranimi ekstrakti ter mase koncentriranih ekstraktov.

Tabela 9: Zatehtane mase bučk, mase bučk s koncentriranim ekstraktom in mase koncentriranega ekstrakta pri ekstrakciji s stresanjem.

| Paralelka: | Masa bučke: | Masa bučke in koncentriranega ekstrakta: | Masa koncentriranega ekstrakta: |
|------------|-------------|--|---------------------------------|
| A1         | 135,91 g    | 170,08 g                                 | 34,17 g                         |
| A2         | 170,00 g    | 184,35 g                                 | 14,35 g                         |
| A3         | 162,75 g    | 169,69 g                                 | 6,94 g                          |
| B1         | 156,99 g    | 205,32 g                                 | 48,33 g                         |
| B2         | 135,91 g    | 166,33 g                                 | 30,42 g                         |
| B3         | 162,75 g    | 193,32 g                                 | 30,57 g                         |
| C1         | 170,00 g    | 210,90 g                                 | 40,90 g                         |
| C2         | 156,99 g    | 196,83 g                                 | 39,84 g                         |
| C3         | 162,75 g    | 186,57 g                                 | 23,82 g                         |

4

<sup>4</sup> Podrobnejši podatki o masah so v prilogi.

Tabela 10: Zatehtane mase bučk, mase bučk s koncentriranim ekstraktom in mase koncentriranega ekstrakta pri navadni ekstrakciji.

| Paralelka:       | Masa bučke: | Masa bučke in koncentriranega ekstrakta: | Masa koncentriranega ekstrakta: |
|------------------|-------------|--|---------------------------------|
| A1* <sup>5</sup> | 169,60 g    | 258,96 g                                 | 89,36 g                         |
| A2*              | 156,98 g    | 184,43 g                                 | 27,45 g                         |
| A3*              | 161,99 g    | 172,20 g                                 | 10,21 g                         |
| B1*              | 169,60 g    | 216,05 g                                 | 46,45 g                         |
| B2*              | 156,98 g    | 197,67 g                                 | 40,69 g                         |
| B3*              | 161,99 g    | 192,98 g                                 | 30,99 g                         |
| C1*              | 162,47 g    | 219,51 g                                 | 57,04 g                         |
| C2*              | 162,47 g    | 195,38 g                                 | 32,91 g                         |
| C3*              | 162,47 g    | 196,50 g                                 | 34,03 g                         |



Slika 13: Uparevanje z rotavaporjem. (Lasten vir)



Slika 14: Ekstrakt po uparevanju z rotavaporjem. (Lasten vir)

### 3.5 Določevanje suhe snovi

Vsakemu koncentriranemu vzorcu določimo še delež suhe snovi, izračunamo pa tudi izkoristek ekstrakcije, za to uporabljamo inventar, naveden v tabeli 11.

Tabela 11: Inventar, uporabljen pri določanju suhe snovi.

| Količina: | Inventar:               |
|-----------|-------------------------|
| 1 x       | laboratorijski sušilnik |
| 1 x       | kapalka                 |
| 6 x       | keramična izparilnica   |
| 1 x       | precizna tehtnica       |

<sup>5</sup> Vzorci označeni z zvezdico so ekstrahirani s postopkom navadne ekstrakcije.

Za vsak vzorec izvedemo dve paralelki določitve suhe snovi, iz teh mas pa potem izračunamo povprečne. Na izparilnico zatehtamo okoli 2 grama ekstrakta s kapalko, predhodno pa stehtamo tudi prazno izparilnico. Nato izparilnice sušimo eno uro pri temperaturi 70 °C.

Po končanem sušenju prestavimo izparilnice iz sušilnika v eksikator, da se ohladijo, ko pa se ohladijo, jih stehtamo. Iz zatehtanih mas izračunamo delež suhe snovi, maso suhe snovi in izkoristek ekstrakcije.

V tabelah 12 in 14 so navedene povprečne mase izparilnic, ekstraktov za sušenje in izparilnic s sušino, v tabelah 13 in 15 pa je izračunan delež suhe snovi, masa suhe snovi in izkoristek ekstrakcije.

*Tabela 12: Povprečne mase izparilnic, ekstraktov za sušenje in izparilnic s sušino pri ekstrakciji s stresanjem.*

| Paralelka: | Povprečna masa izparilnic: | Povprečna masa ekstrakta za sušenje: | Povprečna masa izparilnice s sušino: |
|------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| A1         | 86,890 g                   | 2,015 g                              | 86,905 g                             |
| A2         | 93,485 g                   | 2,005 g                              | 93,520 g                             |
| A3         | 93,170 g                   | 1,075 g                              | 93,175 g                             |
| B1         | 87,565 g                   | 2,020 g                              | 88,275 g                             |
| B2         | 92,820 g                   | 2,020 g                              | 94,055 g                             |
| B3         | 93,185 g                   | 2,085 g                              | 94,050 g                             |
| C1         | 92,830 g                   | 2,005 g                              | 93,490 g                             |
| C2         | 87,545 g                   | 2,045 g                              | 88,100 g                             |
| C3         | 93,225 g                   | 1,000 g                              | 93,585 g                             |

*Tabela 13: Delež suhe snovi, masa suhe snovi in izkoristek ekstrakcije pri vzorcih ekstrakcije s stresanjem.*

| Paralelka: | Delež suhe snovi: | Masa suhe snovi: | Izkoristek ekstrakcije: |
|------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| A1         | 0,007444          | 0,2544 g         | 1,269 %                 |
| A2         | 0,1746            | 0,2505 g         | 1,244 %                 |
| A3         | 0,004651          | 0,03228 g        | 0,1612 %                |
| B1         | 0,3515            | 16,99 g          | 84,51 %                 |
| B2         | 0,6114            | 18,60 g          | 92,34 %                 |
| B3         | 0,4149            | 12,68 g          | 62,91 %                 |
| C1         | 0,3292            | 13,46 g          | 66,91 %                 |
| C2         | 0,2714            | 10,81g           | 53,93 %                 |
| C3         | 0,3600            | 8,575 g          | 42,79 %                 |

*Tabela 14: Povprečne mase izparilnic, ekstraktov za sušenje in izparilnic s sušino pri navadni ekstrakciji.*

| Paralelka: | Povprečna masa izparilnic: | Povprečna masa ekstrakta za sušenje: | Povprečna masa izparilnice s sušino: |
|------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| A1*        | 93,175 g                   | 2,080 g                              | 93,220 g                             |
| A2*        | 89,845 g                   | 2,080 g                              | 89,900 g                             |
| A3*        | 96,140 g                   | 2,190 g                              | 96,160 g                             |
| B1*        | 88,880 g                   | 2,040 g                              | 89,605 g                             |
| B2*        | 100,455 g                  | 2,265 g                              | 101,390 g                            |
| B3*        | 175,800 g                  | 2,115 g                              | 176,585 g                            |
| C1*        | 176,265 g                  | 2,180 g                              | 176,655 g                            |
| C2*        | 89,190 g                   | 2,135 g                              | 89,935 g                             |
| C3*        | 93,825 g                   | 2,085 g                              | 94,050 g                             |

Tabela 15: Delež suhe snovi, masa suhe snovi in izkoristek ekstrakcije pri vzorcih navadne ekstrakcije.

| Paralelka: | Delež suhe snovi: | Masa suhe snovi: | Izkoristek ekstrakcije: |
|------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| A1*        | 0,02163           | 1,284 g          | 6,326 %                 |
| A2*        | 0,02644           | 0,7258 g         | 3,593 %                 |
| A3*        | 0,009132          | 0,09324 g        | 0,4662 %                |
| B1*        | 0,3554            | 16,51 g          | 80,56 %                 |
| B2*        | 0,4128            | 16,80 g          | 83,57 %                 |
| B3*        | 0,3711            | 11,50 g          | 57,37 %                 |
| C1*        | 0,1789            | 10,20 g          | 50,92 %                 |
| C2*        | 0,3489            | 11,48 g          | 56,91 %                 |
| C3*        | 0,1079            | 3,672 g          | 18,22 %                 |

### 3.5.1 Izračun deleža in mase suhe snovi ter izkoristka ekstrakcije

a) masni delež suhe snovi:

$$W (\text{suhe snovi}) = \frac{\overline{m (\text{izparilnice + sušine})} - \overline{m (\text{izparilnice})}}{\overline{m (\text{ekstrakta za sušenje})}} \cdot 100 \%$$

$$W (\text{suhe snovi A1}) = \frac{86,905 \text{ g} - 86,890 \text{ g}}{2,015 \text{ g}} = \mathbf{0,007444}$$

b) masa suhe snovi:

$$m (\text{suhe snovi}) = W (\text{suhe snovi}) \cdot m (\text{koncentriranega ekstrakta})$$

$$m (\text{suhe snovi A1}) = 0,007444 \cdot 34,17 \text{ g} = \mathbf{0,2544 \text{ g}}$$

c) izkoristek ekstrakcije:

$$\eta (\text{ekstrakcije}) = \frac{m (\text{suhe snovi})}{m (\text{vzorca})} \cdot 100 \%$$

$$\eta (\text{ekstrakcije A1}) = \frac{0,2544 \text{ g}}{20,04 \text{ g}} \cdot 100 \% = \mathbf{1,269 \%}$$

Vse izračune naprej računamo po enakem postopku.



Slika 15: Zatehtanje izparilnice. (Lasten vir)



Slika 16: Izparilnice po sušenju v eksikatorju. (Lasten vir)

### 3.6 Tankoplastna kromatografija

V vseh ekstraktih preverimo prisotnost limonena s tankoplastno kromatografijo.

#### 3.7.1. Kromatografija z nečistim limonenom

Najprej prisotnost limonena preverimo s standardom limonena, ki sicer ni 100 % čist, saj se na kromatogramu pod UV lučjo pri limonenu pojavijo tri lise, kar pomeni, da je ta standard onesnažen. Uporabljamo inventar, naveden v tabeli 16 in kemikalije navedene v tabeli 17.

Tabela 16: Inventar, uporabljen pri kromatografiji z nečistim limonenom.

| Količina: | Inventar:             |
|-----------|-----------------------|
| 2 x       | kromatografska komora |
| 3 x       | kromatografska plošča |
| 2 x       | kapalka               |
| /         | kapilare              |
| 1 x       | čaša, 150 mL          |
| 1 x       | merilni valj, 25 mL   |
| 1 x       | sušilnik              |

Tabela 17: Kemikalije, uporabljene pri kromatografiji z nečistim limonenom.

| Količina: | Kemikalija:   |
|-----------|---|
| /         | limonen - nečist  |
| 27 mL     | heksan, $\geq 95\%$<br>        |
| 3 mL      | etil acetat, $\geq 99,5\%$<br> |

Najprej pripravimo mobilno fazo, ki je sestavljena iz heksana in etil acetata v razmerju 9 : 1. Mobilno fazo prelijemo v kromatografski komori do višine 1 cm in pustimo, da se komori nasitita s parami topila.

Na tri kromatografske plošče s svinčnikom 2 cm od spodnjega roba narišemo črto in nanjo na vsake 2 cm označimo križec. Na vsak prvi križec pri vsaki plošči s kapilaro nanese limonen in nato po vrsti navedene vzorce v tabelah 18, 19 in 20. Ker sta pri uparevanju vzorcev B3 in C3 nastali dve fazi, na kromatogram nanese obe.

*Tabela 18: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 1.*

|         |    |    |    |    |    |                      |                      |    |
|---------|----|----|----|----|----|----------------------|----------------------|----|
| Limonen | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | B3<br>(zgornja faza) | B3<br>(spodnja faza) | C1 |
|---------|----|----|----|----|----|----------------------|----------------------|----|

*Tabela 19: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 2.*

|         |    |                      |                      |                  |     |     |     |     |
|---------|----|----------------------|----------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|
| Limonen | C2 | C3<br>(zgornja faza) | C3<br>(spodnja faza) | A1* <sup>6</sup> | A2* | A3* | B1* | B2* |
|---------|----|----------------------|----------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|

*Tabela 20: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 3.*

|         |     |     |     |     |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| Limonen | B3* | C1* | C2* | C3* |
|---------|-----|-----|-----|-----|



*Slika 17: Priprava kromatografskih plošč.  
(Lasten vir)*



*Slika 18: Potek kromatografije. (Lasten vir)*



*Slika 19: Kemikalije in inventar, uporabljen pri pripravi mobilne faze. (Lasten vir)*

<sup>6</sup> Vzorca označeni z zvezdico so ekstrahirani s postopkom navadne ekstrakcije.

### 3.7.2. Kromatografija s standardom in identifikacija kromatogramov

TLC kromatografijo nato izvedemo še enkrat, tokrat s čistim standardom. Uporabljamo inventar, naveden v tabeli 21, in kemikalije, navedene v tabeli 22, namesto limonena na prvo mesto naneseemo standard limonena, naprej pa vzorce, navedene v tabelah 23, 24 in 25.

Tabela 21: Inventar, uporabljen pri kromatografiji s standardom in identifikaciji kromatogramov.

| Količina: | Inventar:             |
|-----------|-----------------------|
| 2 x       | kromatografska komora |
| 3 x       | kromatografska plošča |
| 2 x       | kapalka               |
| /         | kapilare              |
| 1 x       | čaša, 150 mL          |
| 1 x       | merilni valj, 25 mL   |
| 1 x       | UV – komora           |
| 1 x       | sušilnik              |
| 1 x       | pršilka               |

Tabela 22: Kemikalije, uporabljene pri kromatografiji s standardom in identifikaciji kromatogramov.

| Količina: | Kemikalija:  |
|-----------|--|
| /         | limonen – standard<br>           |
| 27 mL     | heksan, ≥ 95 %<br>              |
| 3 mL      | etil acetat, ≥ 99,5 %<br>       |
| /         | kalijev permanganat, 0,02 M<br> |

Tabela 23: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 4.

|          |    |    |    |    |    |                         |                         |    |
|----------|----|----|----|----|----|-------------------------|-------------------------|----|
| Standard | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | B3<br>(zgornja<br>faza) | B3<br>(spodnja<br>faza) | C1 |
|----------|----|----|----|----|----|-------------------------|-------------------------|----|

Tabela 24: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 5.

|          |    |                         |                         |                  |     |     |     |     |
|----------|----|-------------------------|-------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|
| Standard | C2 | C3<br>(zgornja<br>faza) | C3<br>(spodnja<br>faza) | A1* <sup>7</sup> | A2* | A3* | B1* | B2* |
|----------|----|-------------------------|-------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|

Tabela 25: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 6.

|          |     |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|-----|
| Standard | B3* | C1* | C2* | C3* |
|----------|-----|-----|-----|-----|

<sup>7</sup> Vzorci označeni z zvezdico so ekstrahirani s postopkom navadne ekstrakcije.

Kromatograme postavimo v kromatografski komori in pustimo, da se razvijejo. Ko se razvijejo, jih vzamemo iz kromatografskih komor, označimo fronto topila in jih posušimo s sušilnikom.

Suhe kromatograme pogledamo pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm. Na mestu, kjer smo nanegli standard, ni bilo nobene lise, kot je bila pri prejšnji paralelki kromatografije. Kromatograme nato pogledamo še pod UV lučjo valovne dolžine 366 nm, tam pa se je na mestu nanosa standarda pojavila zelo nežna temna lisa. S to identifikacijo nismo zadovoljni, zato poizkusimo še z identifikacijo s škropljenjem z raztopino  $\text{KMnO}_4$ , kjer naj bi se pri alkenih oziroma ogljikovodikih z multiplo vezjo z oksidacijo tvoril rjav  $\text{MnO}_2$ , se pravi, da bi se naj tudi lisa limonena prebarvala v rjavo. Najprej poštopimo prvi kromatogram iz prejšnje paralelke, da se prepričamo v zanesljivost metode in pokaže se, da je ta metoda zaneslivejša kot metoda identifikacije z UV lučjo.

Identifikacijo z raztopino  $\text{KMnO}_4$  izvedemo tudi na vseh treh kromatogramih, ki jih razvijemo s standardom. Pri vseh treh se limonen sicer ne obarva rjavo, kot naj bi se, ampak fluorescenčno rumeno. S tem lahko ugotovimo, da je limonen prisoten v 14 vzorcih: v B1, B2, zgornji fazi B3, C1, C2, zgornji fazi C3, spodnji fazi C3, A3\*, B1\*, B2\*, B3\*, C1\*, C2\* in C3\*.



*Slika 20: Kromatogram št. 1 z nanešenim nečistim limonenom in vzorci. (Lasten vir)*



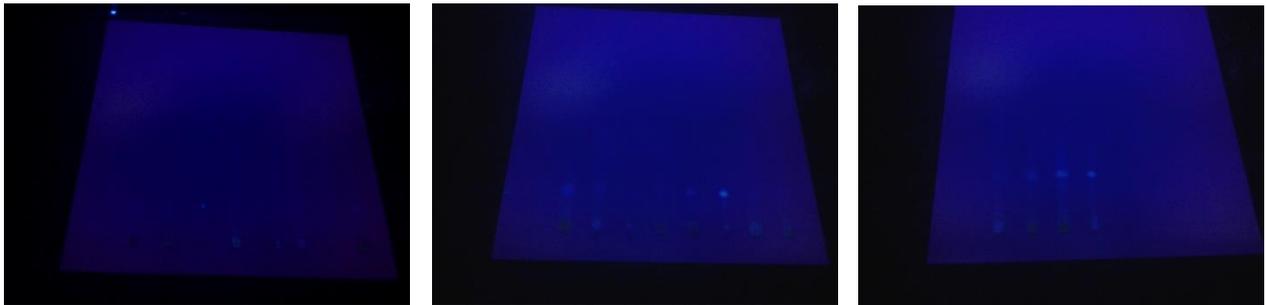
*Slika 21: Kromatogram št. 1 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino  $\text{KMnO}_4$ . (Lasten vir)*



*Slika 22: Kromatogram št. 1 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm. (Lasten vir)*



Slika 23: Kromatogrami št. 4, 5 in 6 z nanešenimi standardom in vzorci. (Lasten vir)



Slika 24: Kromatogrami št. 4, 5 in 6 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm. (Lasten vir)



Slika 25: Kromatogrami št. 4, 5 in 6 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino  $KMnO_4$ . (Lasten vir)

### 3.7 Priprava vzorcev za plinsko kromatografijo

Vseh 14 vzorcev, ki jim s TLC metodo dokažemo vsebnost limonena, želimo poslati na GC analizo na Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, kjer nam svetujejo, da naj zaradi morebitne zamašitve kolone zaradi viskoznosti in nečistosti vzorcev limonen iz ekstrahiranih vzorcev pridobimo s ponovno ekstrakcijo in stresanjem, tokrat s diklorometanom. Limonen naj bi prešel v fazo diklorometana, to fazo pa bi nato lahko analizirali s plinsko kromatografijo. Svetovali so nam še možnost destilacije z vodno paro, ampak smo se odločili za tekočinsko ekstrakcijo.

#### 3.8.1. Preizkus mešanja in topnosti

Vzorci torej pripravimo za plinsko kromatografijo. Uporabljamo inventar, naveden v tabeli 26, in kemikalije, navedene v tabeli 27.

Tabela 26: Inventar, uporabljen pri preizkusu mešanja in toposti.

| Količina: | Inventar:           |
|-----------|---------------------|
| 4 x       | čaša, 100 mL        |
| 5 x       | epruveta z zamaškom |
| 4 x       | kapalka             |
| 1 x       | stojalo za epruvete |

Tabela 27: Kemikalije, uporabljene pri preizkusu mešanja in topnosti.

| Količina: | Kemikalija:   |
|-----------|---|
| /         | limonen – standard<br> |
| 4 mL      | heksan, ≥ 95 %<br>     |
| 4 mL      | aceton, ≥ 99,5 %<br>   |
| 4 mL      | etanol, ≥ 98 %<br>     |
| 16 mL     | diklorometan<br>       |
| 4 mL      | destilirana voda  |

Najprej poizkusno preverimo mešanje s prvotnimi ekstrakcijskimi topili in diklorometanom. V epruvete nalijemo po 4 mL diklorometana in dodamo v vsako po 4 mL etanola, acetona, heksana oz. vode. Pričakujemo, da se bosta fazi ustvarili v vseh primerih razen pri heksanu, ker je prav tako nepolaren kot diklorometan, a se fazi ne ustvarita v nobenem primeru, razen pri heksanu, zato se moramo domisliti druge metode ločitve ekstrakcijskega topila in limonena.

Poskusimo še s heksanom in vodo, ker se limonen ne meša z vodo, ampak se topi v heksanu in ker se heksan z vodo ne meša, etanol in acetona pa se, lahko sklepamo, da se bosta ustvarili dve plasti - etanol oz. acetona se bo zmešal z vodo, limonen pa bo prešel v zgornjo heksanovo fazo.

### 3.8.2. Poskusna ekstrakcija in kromatografija neshranjenih vzorcev

V epruvete nalijemo po 4 mL vode, 4 mL heksana in 4 mL vzorca, ki ga nismo shranili za GC analizo, ampak, je ostal od uparevanja, ter stresamo. Ustvarita se dve fazi: spodnja, kjer je bilo topilo, in voda, poleg tega se ustvarijo tudi druge oborine in heksanova faza. Da se prepričamo v to, ali je limonen v zgornji heksanovi fazi, izvedemo še tankoplastno kromatografijo vseh zgornjih faz. Uporabljamo inventar, naveden v tabeli 28, in kemikalije, navedene v tabeli 29.

Tabela 28: Inventar, uporabljen pri poskusni ekstrakciji in kromatografiji neshranjenih vzorcev.

| Količina: | Inventar:             |
|-----------|-----------------------|
| 1 x       | kromatografska komora |
| 2 x       | kromatografska plošča |
| 2 x       | kapalka               |
| /         | kapilare              |
| 1 x       | čaša                  |
| 1 x       | merilni valj, 25 mL   |
| 1 x       | UV – komora           |
| 1 x       | sušilnik              |
| 1 x       | pršilka               |
| 1 x       | stojalo za epruvete   |

Tabela 29: Kemikalije, uporabljene pri poskusni ekstrakciji in kromatografiji neshranjenih vzorcev.

| Količina: | Kemikalija:  |
|-----------|--|
| /         | limonen – standard<br>            |
| 58 mL     | heksan, ≥ 95 %<br>                |
| 2 mL      | etil acetat, ≥ 99,5 %<br>         |
| /         | kalijev permanganat, 0,02 M<br> |
| 40 mL     | destilirana voda   |

Na kromatografsko ploščo nanesemo vzorce, navedene v tabelah 24 in 25.

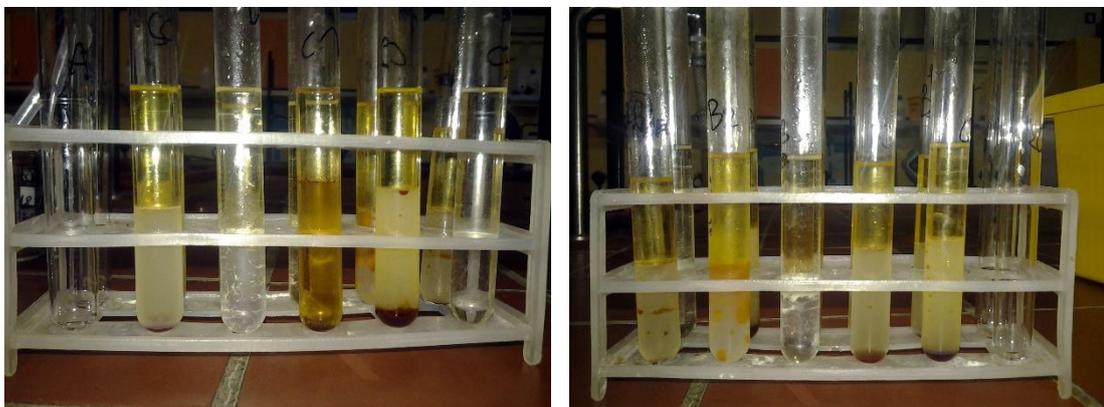
Tabela 30: Razporeditev vzorcev na kromatogramu št. 7.

|          |    |    |    |    |    |
|----------|----|----|----|----|----|
| Standard | B1 | B2 | B3 | C1 | C2 |
|----------|----|----|----|----|----|

Tabela 31: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 8.

|          |     |     |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Standard | B2* | B3* | C1* | C2* | C3* |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|

S heksanom in vodo ekstrahiramo in stresamo vseh 14 vzorcev, razen A3\*, in zgornje ter spodnje faze C3, ker so vzorci že porabljeni in shranjeni za plinsko kromatografijo. Plošče nato identificiramo pod UV lučjo in s potapljanjem v raztopino  $\text{KMnO}_4$ . V vseh vzorcih tako z identifikacijo pod UV lučjo kot s potapljanjem v raztopino  $\text{KMnO}_4$  ugotovimo prisotnost limonena, kar pomeni, da je bila ekstrakcija s heksanom uspešna.



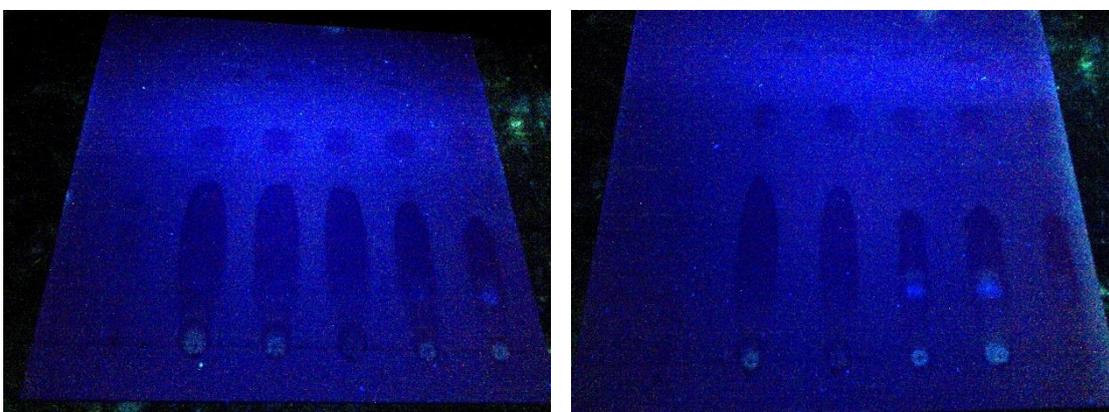
Slika 26: Neshranjeni vzorci po stresanju s heksanom in vodo. (Lasten vir)



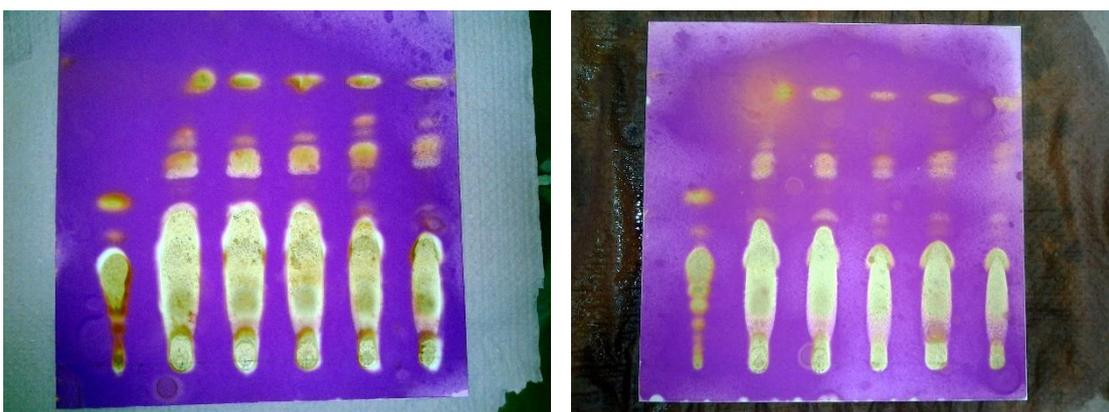
Slika 27: Kromatograma št. 7 in 8 z nanešenim standardom in heksanovimi fazami. (Lasten vir)



Slika 28: Kromatograma št. 7 in 8 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm. (Lasten vir)



Slika 29: Kromatograma št. 7 in 8 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 366 nm. (Lasten vir)



Slika 30: Kromatograma št. 7 in 8 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino  $KMnO_4$ . (Lasten vir)

### 3.8.3. Ekstrakcija in kromatografija vzorcev, namenjenih za GC analizo

Ekstrakcijo in stresanje s heksanom in vodo nato ponovimo še pri vzorcih, namenjenih za plinsko kromatografijo. V epruvete nalijemo po 4 mL vode, 4 mL heksana in 4 mL vzorca ter stresamo. Ponovno se tvori dve fazi, zgornje faze vzorcev pa nato ponovno nanese na kromatografsko ploščo. Na vsak kromatogram poleg standarda nanese tudi limonen, ki ni 100 % čist. Uporabljamo inventar naveden v tabeli 32, in kemikalije, navedene v tabeli 33.

Tabela 32: Inventar, uporabljen pri ekstrakciji in kromatografiji vzorcev, namennjenih za GC analizo.

| Količina: | Inventar:             |
|-----------|-----------------------|
| 1 x       | kromatografska komora |
| 2 x       | kromatografska plošča |
| 2 x       | kapalka               |
| /         | kapilare              |
| 1 x       | čaša, 150 mL          |
| 1 x       | merilni valj, 25 mL   |
| 1 x       | UV – komora           |
| 1 x       | sušilnik              |
| 1 x       | pršilka               |
| 1 x       | stojalo za epruvete   |

Tabela 33: Kemikalije, uporabljene pri ekstrakciji in kromatografiji vzorcev, namennjenih za GC analizo.

| Količina: | Kemikalija:  |
|-----------|--|
| /         | limonen – standard<br>          |
| /         | limonen - nečist   |
| 74 mL     | heksan, ≥ 95 %<br>              |
| 2 mL      | etil acetat, ≥ 99,5 %<br>       |
| /         | kalijev permanganat, 0,02 M<br> |
| 56 mL     | destilirana voda   |

Razpored vzorcev na kromatografski plošči je naveden v tabelah 34 in 35.

Tabela 34: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 9.

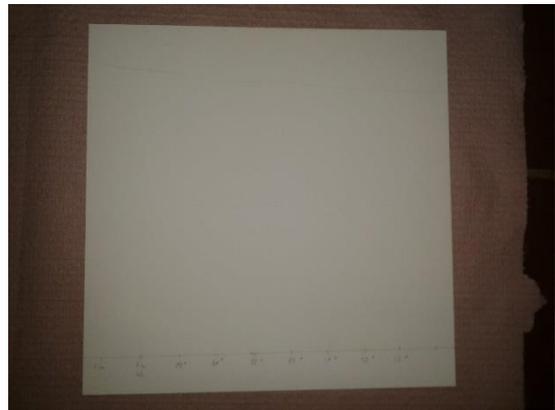
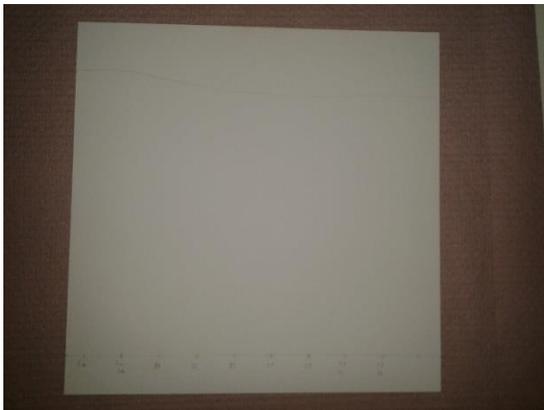
| Standard | Limonen | B1 | B2 | B3<br>(zgornja<br>faza) | C1 | C2 | C3<br>(zgornja<br>faza) | C3<br>(spodnja<br>faza) |
|----------|---------|----|----|-------------------------|----|----|-------------------------|-------------------------|
|          |         |    |    |                         |    |    |                         |                         |

Tabela 35: Razpored vzorcev na kromatogramu št. 10.

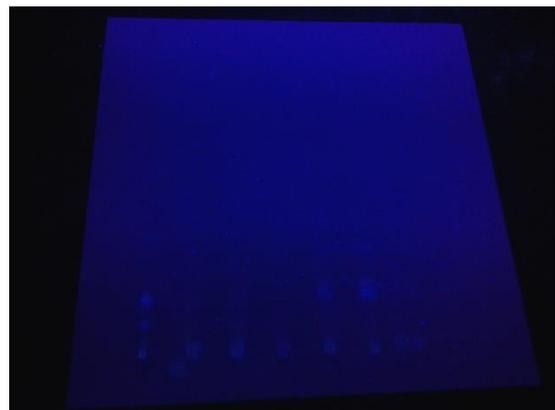
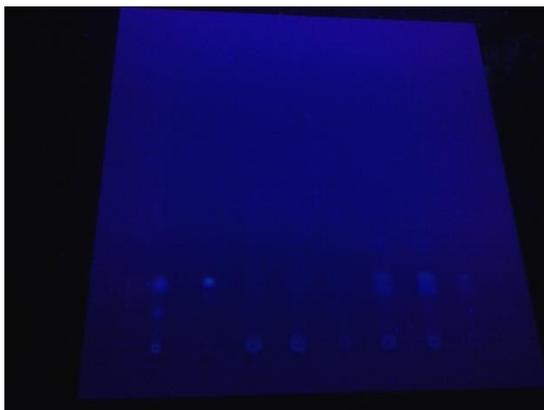
| Standard | Limonen | A3* | B1* | B2* | B3* | C1* | C2* | C3* |
|----------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          |         |     |     |     |     |     |     |     |



*Slika 31: Vzorci, namenjeni za GC analizo po stresanju s heksanom in vodo. (Lasten vir)*



*Slika 32: Kromatograma št. 9 in 10 z nanešenim standardom, nečistim limonenom in heksanovimi fazami. (Lasten vir)*



*Slika 33: Kromatograma št. 9 in 10 pri identifikaciji pod UV lučjo valovne dolžine 254 nm. (Lasten vir)*



Slika 34: Kromatograma št. 9 in 10 pri identifikaciji s škropljenjem z raztopino  $KMnO_4$ . (Lasten vir)

## 2.9 Plinska kromatografija

Vseh 14 vzorcev, ki so vsebovali limonen, po vseh analizah na koncu analiziramo še s plinsko kromatografijo, da bi ugotovili koncentracijo limonena v vzorcih. Ker plinska kromatografija v šoli ni bila izvedljiva z Mini GC plinskim kromatografom, smo vzorce nesli na Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, za pripravo vzorcev pa smo potrebovali inventar, naveden v tabeli 36.

Tabela 36: Inventar, uporabljen pri pripravi vzorcev za plinsko kromatografijo.

| Količina: | Inventar:                  |
|-----------|----------------------------|
| 14 x      | viala, 2 mL                |
| 14 x      | pokrovček za vialo         |
| 1 x       | kleščice za zapiranje vial |
| 1 x       | kleščice za odpiranje vial |
| 1 x       | stojalo za viale           |
| 14 x      | kapalka                    |
| 1 x       | čaša, 50 mL                |

Za pripravo vzorcev v vialo, ki jo označimo s številko, odmerimo po 1 mL zgornje heksanove faze vzorca. Na vialo namestimo pokrovček in vialo zaplombiramo s kleščami za zapiranje.



Slika 35: Vzorca v vialah, pripravljene za plinski kromatograf. (Lasten vir)

V prilogi sta podana dva vzorca kromatogramov plinske kromatografije, v tabeli 37 pa so prikazani rezultati plinske kromatografije vzorcev heksanovih faz.

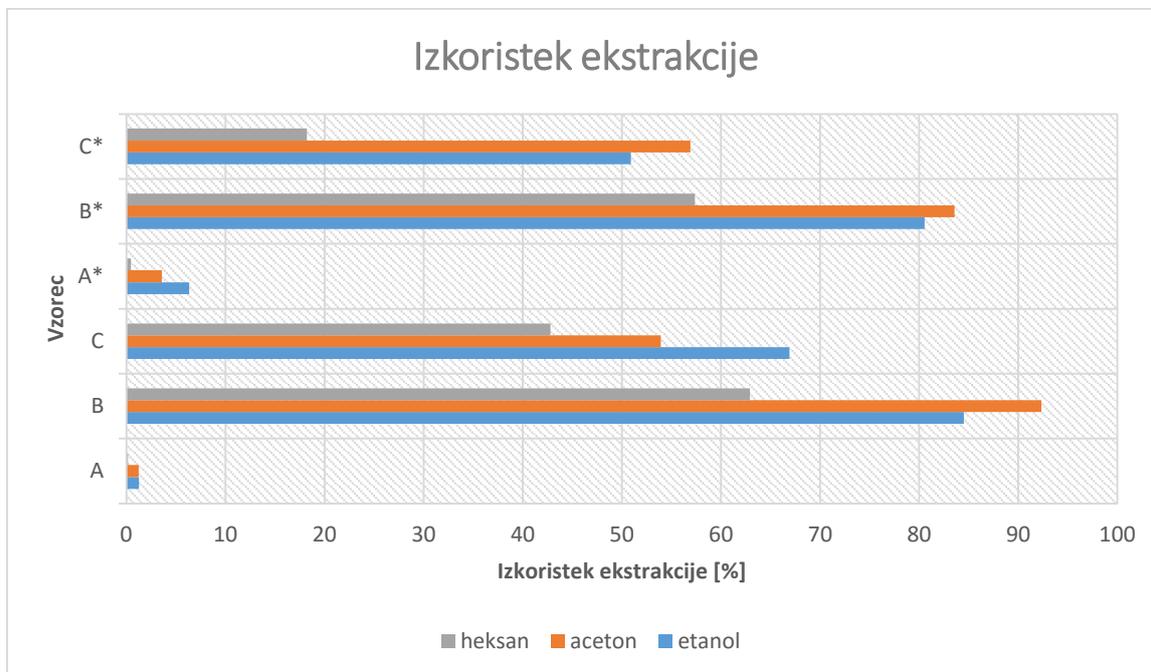
*Tabela 37: Masne koncentracije limonena v posameznih vzorcih heksanovih faz.*

| Paralelka:        | Vzorec:  | Koncentracija limonena: |
|-------------------|--|-------------------------|
| B1                | - smola brez vpliva lubadarja<br>- ekstrakcija s stresanjem z etanolom | 2,0 mg/L                |
| B2                | - smola brez vpliva lubadarja<br>- ekstrakcija s stresanjem z acetonom | 1,1 mg/L                |
| B3                | - smola brez vpliva lubadarja<br>- ekstrakcija s stresanjem s heksanom | 162,5 mg/L              |
| C1                | - smola z vplivom lubadarja<br>- ekstrakcija s stresanjem z etanolom   | 0 mg/L                  |
| C2                | - smola z vplivom lubadarja<br>- ekstrakcija s stresanjem z acetonom   | 55,0 mg/L               |
| C3 (zgornja faza) | - smola z vplivom lubadarja<br>- ekstrakcija s stresanjem z acetonom   | 46,9 mg/L               |
| C3 (spodnja faza) | - smola z vplivom lubadarja<br>- ekstrakcija s stresanjem z acetonom   | 0,7 mg/L                |
| A3*               | - luske storžev<br>- navadna ekstrakcija s heksanom                    | 0 mg/L                  |
| B1*               | - smola brez vpliva lubadarja<br>- navadna ekstrakcija z etanolom      | 3,1 mg/L                |
| B2*               | - smola brez vpliva lubadarja<br>- navadna ekstrakcija z acetonom      | 0 mg/L                  |
| B3*               | - smola brez vpliva lubadarja<br>- navadna ekstrakcija s heksanom      | 0 mg/L                  |
| C1*               | - smola z vplivom lubadarja<br>- navadna ekstrakcija z etanolom        | 8,5 mg/L                |
| C2*               | - smola z vplivom lubadarja<br>- navadna ekstrakcija z acetonom        | 4,5 mg/L                |
| C3*               | - smola z vplivom lubadarja<br>- navadna ekstrakcija s heksanom        | 111,2 mg/L              |

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Ekstrakcija

Pri raziskovalni nalogi dobimo najprej rezultate izkoristkov ekstrakcij.



Slika 36: Graf, ki prikazuje izkoristke ekstrakcij posameznih vzorcev pri dveh vrstah ekstrakcije s tremi različnimi topili.

Glede na izkoristke ekstrakcije ne moremo sklepati na nadaljnjo vsebnost limonena v vzorcih, saj je v ekstraktu poleg limonena veliko tudi drugih terpenov, ki so sestavine rastlinskih smol. Iz grafa lahko razberemo, da je pri večini vzorcev najprimernejše topilo za ekstrakcijo aceton, razen pri vzorcih A in C, največji izkoristek ekstrakcije pa pridobimo iz vzorca smole brez vpliva lubadarja pri ekstrakciji s stresanjem.

### 4.2 Tankoplastna kromatografija

Pri vseh paralelkah tankoplastne kromatografije smo ugotavljali prisotnost limonena v vzorcih. Pri prvi paralelki kromatografije z laboratorijskim limonenom, čistost limonena sicer ni bila pomembna, ker pa so se pri identifikaciji pod UV lučjo pojavile tri lise, smo zaradi kontrole naredili še drugo paralelko kromatografije s čistim standardom limonena. Prišli smo do rezultatov, podanih v tabelah 37 in 38.

Tabela 38: Prisotnost limonena v posameznih vzorcih pri ekstrakciji s stresanjem.

| Paralelka:        | Vsebnost limonena:  |
|-------------------|---------------------|
| A1                | limonen NI prisoten |
| A2                | limonen NI prisoten |
| A3                | limonen NI prisoten |
| B1                | limonen JE prisoten |
| B2                | limonen JE prisoten |
| B3 (zgornja faza) | limonen JE prisoten |
| B3 (spodnja faza) | limonen NI prisoten |
| C1                | limonen JE prisoten |
| C2                | limonen JE prisoten |
| C3 (zgornja faza) | limonen JE prisoten |
| C3 (spodnja faza) | limonen JE prisoten |

Tabela 39: Prisotnost limonena v posameznih vzorcih pri navadni ekstrakciji.

| Paralelka: | Vsebnost limonena:  |
|------------|---------------------|
| A1*        | limonen NI prisoten |
| A2*        | limonen NI prisoten |
| A3*        | limonen JE prisoten |
| B1*        | limonen JE prisoten |
| B2*        | limonen JE prisoten |
| B3*        | limonen JE prisoten |
| C1*        | limonen JE prisoten |
| C2*        | limonen JE prisoten |
| C3*        | limonen JE prisoten |

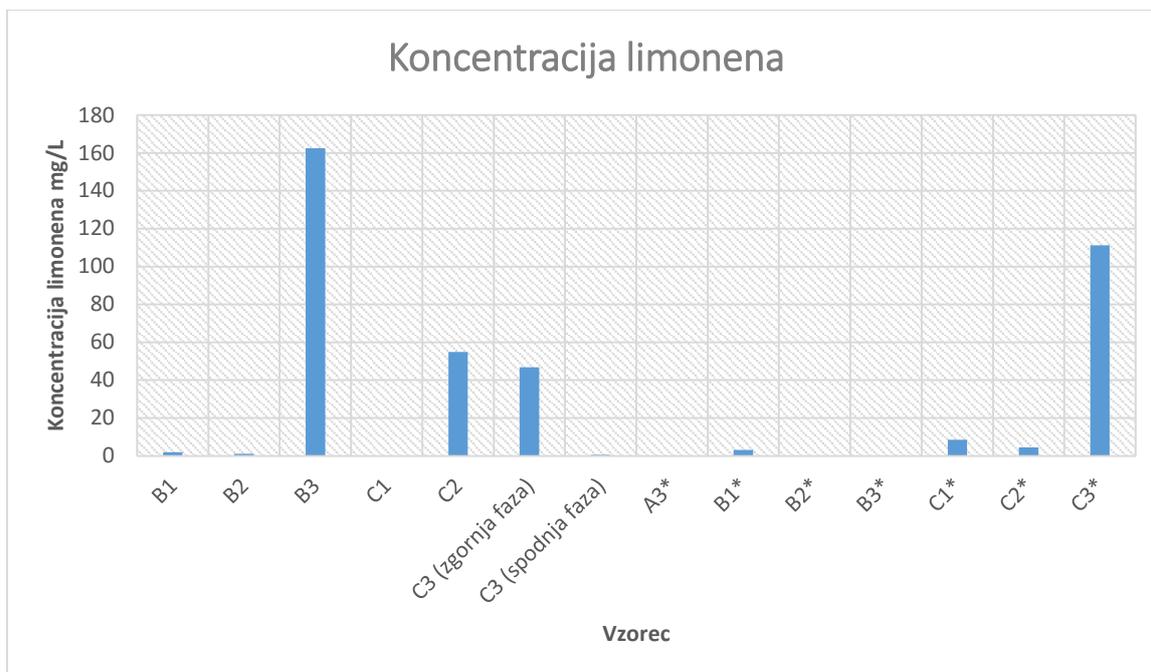
Iz teh rezultatov sklepamo, da je limonen prisoten v vzorcih smole brez vpliva lubadarja in v vzorcih smole pod vplivom lubadarja, medtem ko ga v vzorcih storžev ni.

Potrebno je poudariti, da je ekstrakcija učinkovitejša, če povečamo ekstrakcijsko površino, kar smo storili pri drugi paralelki storžev. Pokazalo se je, da je v enem od treh vzorcev storžev limonen, kljub temu da ga pri prvi paralelki ni bilo zaznati.

V vzorcih, v katerih je bil limonen prisoten, smo nato izvedli še stresanje s heksanom in vodo ter ponovno preverili vsebnost limonena. Prišli smo do ugotovitev, da je v vseh 14 vzorcih limonen prisoten tudi po stresanju s heksanom in vodo v heksanovi fazi.

### 4.3 Plinska kromatografija

Vzorci, ki so po stresanju s heksanom in vodo še vedno vsebovali limonen, smo nato analizirali s plinsko kromatografijo; za pomoč smo prosili Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, dobili pa smo naslednje rezultate:



Slika 37: Graf, ki prikazuje koncentracije limonena v posameznih vzorcih.

Pri vzorcih C1, A3\* in B2\* kromatograf ni zaznal komponent limonena, medtem ko je bila pri vzorcu B3\* koncentracija limonena izven območja meritve.

#### 4.3.1 Primerjava koncentracije limonena z vrsto ekstrakcije

Primerjamo rezultate plinske kromatografije glede na vrsto ekstrakcije. Povprečna koncentracija limonena v vzorcih, ekstrahiranih po postopku ekstrakcije s stresanjem, in povprečna koncentracija limonena v vzorcih, ekstrahiranih z navadno ekstrakcijo, je prikazana v tabeli 40.

Tabela 40: Povprečne koncentracije limonena v vzorcih, glede na vrsto ekstrakcije.

| Vrsta ekstrakcije:       | Povprečna koncentracija limonena: |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Ekstrakcija s stresanjem | 38,314 mg/L                       |
| Navadna ekstrakcija      | 18,185 mg/L                       |

Iz podatkov lahko razberemo, da je bila uspešnejša ekstrakcija s stresanjem. Opazimo, da je v povprečju ekstrakcija s stresanjem za 52 % uspešnejša, do tega je prišlo najverjetneje zaradi tehtanja vzorcev. Pri ekstrakciji s stresanjem smo zatehtali res čisto smolo, medtem ko smo za navadno ekstrakcijo, ker je smole že primanjkovalo, zatehtali malo manj čisto.

#### 4.3.2 Primerjava koncentracije limonena z vrsto topila

Primerjamo rezultate plinske kromatografije glede na vrsto ekstrakcijskega topila. Povprečne koncentracije limonena v vzorcih, ekstrahiranih z etanolom, acetonom oz. heksanom, so prikazane v tabeli 41.

Tabela 41: Povprečne koncentracije limonena v vzorcih glede na vrsto ekstrakcijskega topila.

| Vrsta ekstrakcijskega topila: | Povprečna koncentracija limonena: |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| Etanol                        | 3,4 mg/L                          |
| Aceton                        | 15,15 mg/L                        |
| Heksan                        | 53,55 mg/L                        |

Iz podatkov povprečnih koncentracij razberemo, da je bila najuspešnejša ekstrakcija s heksanom, medtem ko je bila ekstrakcija z etanolom najmanj uspešna. Razlog je najverjetneje tudi v tem, da je aceton manj polaren kot etanol, heksan pa je izmed vseh treh topil najmanj polaren, zato se limonen v njem najbolje topi.

#### 4.3.3 Primerjava koncentracije limonena z vrsto vzorca

Primerjamo rezultate plinske kromatografije glede na vrsto vzorca. Povprečne koncentracije limonena v vzorcih storžev, smole brez vpliva lubadarja in smole z vplivom lubadarja so prikazane v tabeli 42.

*Tabela 42: Povprečne koncentracije limonena v vzorcih glede na njihovo vrsto.*

| <b>Vrsta ekstrakcijskega topila:</b> | <b>Povprečna koncentracija limonena:</b> |
|--------------------------------------|--|
| Storži                               | 0 mg/L                                   |
| Smola brez vpliva lubadarja          | 28,11 mg/L                               |
| Smola z vplivom lubadarja            | 32,40 mg/L                               |

Iz podatkov povprečnih koncentracij lahko razberemo, da je vsebnost limonena največja v vzorcih smole pod vplivom lubadarja, manjša povprečna koncentracija je v vzorcih smole brez vpliva lubadarja, medtem ko je pri vzorcih storžev vsebnost limonena 0.

## 5 ZAKLJUČEK

Pri raziskovanju smo si zastavili dve hipotezi:

1. Koncentracija limonena bo večja v vzorcih smole smreke, ki je bila napadena z lubadarjem.
2. Koncentracija limonena bo največja pri ekstrakciji s heksanom.

Prvo hipotezo lahko potrdimo, saj je bila povprečna koncentracija limonena v vzorcih smole smreke, napadene z lubadarjem, večja od povprečnih koncentracij limonena v vzorcih storžev in v vzorcih smole smreke brez vpliva lubadarja.

Drugo hipotezo lahko prav tako potrdimo, ker je bila povprečna koncentracija limonena pri ekstrakciji s heksanom največja.

Potrjujemo tudi ugotovitve virov drugih avtorjev, ki navajajo, da je vsebnost limonena večja v smoli tistih smrek, ki so bile napadene z lubadarjem: »Povečano prisotnost limonena v smoli je zaznati na območjih, kjer je več lubadarja.«<sup>8</sup> in »Večji delež limonena je tako v smoli zaznati na področjih, kjer je bolj razmnožen lubadar.«<sup>9</sup>

---

<sup>8</sup> <http://www.saljic.si/sestavine/limonene>

<sup>9</sup> Vir: <http://hr.smrekovit.com/en/blog/8-blog/6-limonen>

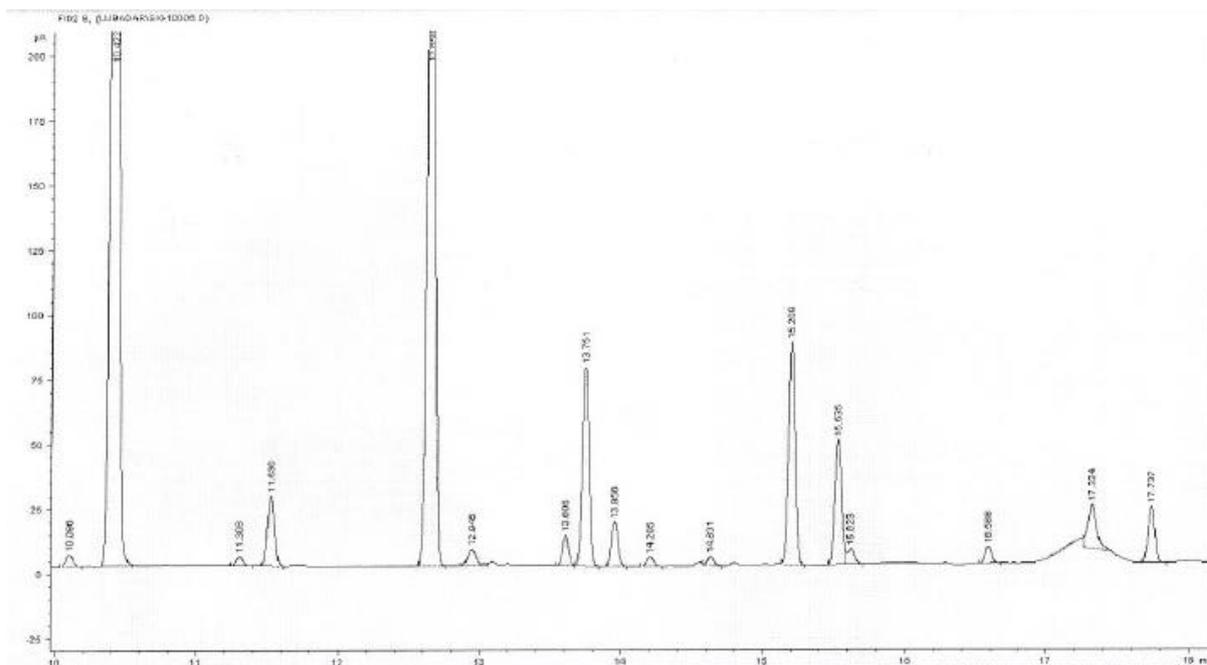
## 6 PRILOGE

Zatehtane mase izparilnic, mase ekstraktov za sušenje, mase izparilnic s sušino, paralelk 1 in 2, iz katerih smo izračunali povprečne mase, so podane v tabeli 39.

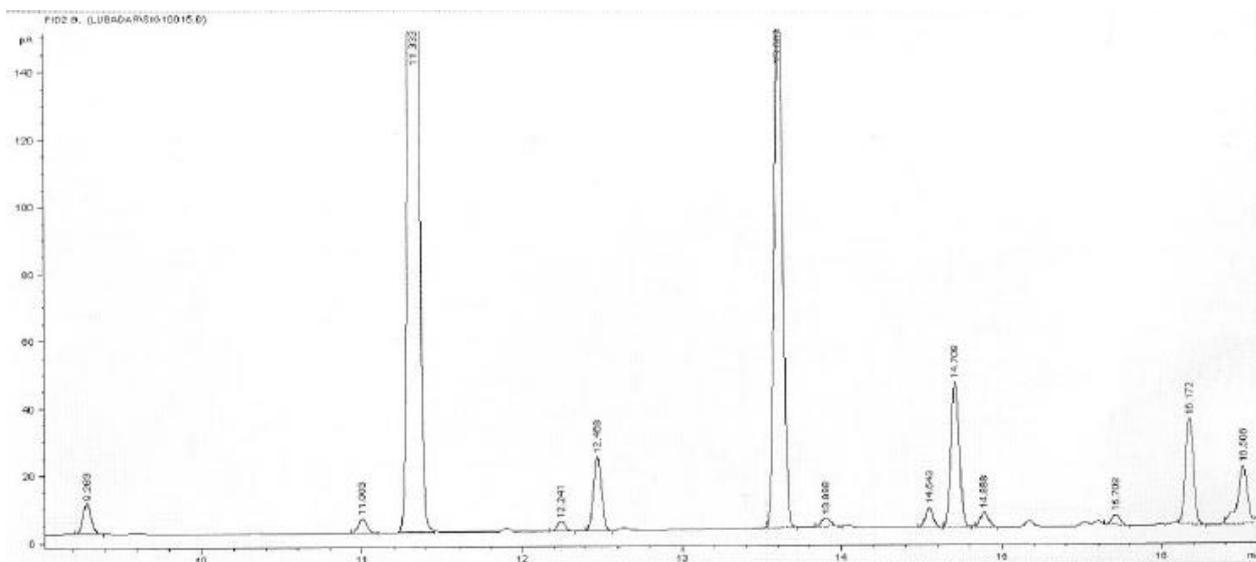
Tabela 43: Mase izparilnic, ekstraktov za sušenje in izparilnic s sušino.

| Paralelka: | Masa izparilnice: |          | Masa ekstrakta za sušenje: |        | Masa izparilnice s sušino: |          |
|------------|-------------------|----------|----------------------------|--------|----------------------------|----------|
|            | 1                 | 2        | 1                          | 2      | 1                          | 2        |
| A1         | 84,60 g           | 89,18 g  | 2,03 g                     | 2,00 g | 84,63 g                    | 89,18 g  |
| A2         | 90,52 g           | 96,45 g  | 2,00 g                     | 2,01 g | 90,55 g                    | 96,49 g  |
| A3         | 97,16 g           | 89,18 g  | 1,05 g                     | 1,10 g | 97,16 g                    | 89,19 g  |
| B1         | 84,64 g           | 90,49 g  | 2,03 g                     | 2,01 g | 85,34 g                    | 91,21 g  |
| B2         | 89,17 g           | 96,47 g  | 2,04 g                     | 2,00 g | 90,46 g                    | 97,65 g  |
| B3         | 97,17 g           | 89,20 g  | 2,08 g                     | 2,09 g | 98,09 g                    | 90,01 g  |
| C1         | 96,48 g           | 89,18 g  | 2,00 g                     | 2,01 g | 97,13 g                    | 89,85 g  |
| C2         | 84,59 g           | 90,50 g  | 2,08 g                     | 2,01 g | 85,15 g                    | 91,05 g  |
| C3         | 97,22 g           | 89,23 g  | 1,00 g                     | 1,00 g | 97,59 g                    | 89,58 g  |
| A1*        | 97,18 g           | 89,17 g  | 2,06 g                     | 2,10 g | 97,24 g                    | 89,20 g  |
| A2*        | 89,19 g           | 90,50 g  | 2,05 g                     | 2,11 g | 89,25 g                    | 90,55 g  |
| A3*        | 95,14 g           | 97,14 g  | 2,20 g                     | 2,18 g | 95,14 g                    | 97,18 g  |
| B1*        | 91,77 g           | 85,99 g  | 2,06 g                     | 2,02 g | 92,50 g                    | 86,71 g  |
| B2*        | 107,61 g          | 93,30 g  | 2,25 g                     | 2,28 g | 108,54 g                   | 94,24 g  |
| B3*        | 176,62 g          | 174,98 g | 2,06 g                     | 2,17 g | 177,38 g                   | 175,79 g |
| C1*        | 175,26 g          | 177,27 g | 2,14 g                     | 2,22 g | 175,64 g                   | 177,67 g |
| C2*        | 89,20 g           | 89,18 g  | 2,12 g                     | 2,15 g | 89,93 g                    | 89,94 g  |
| C3*        | 90,49 g           | 97,16 g  | 2,03 g                     | 2,14 g | 90,70 g                    | 97,40 g  |

Kromatograma plinske kromatografije vzorcev.



Slika 38: Kromatogram plinske kromatografije vzorcev št. 1. (vir: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec)



Slika 39: Kromatogram plinske kromatografije vzorcev št. 2. (vir: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec)

## 7 LITERATURA

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Limonen>, 30. 12. 2015

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Smreka>, 30. 12. 2015

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Ekstrakcija>, 15. 1. 2016

Ignatowitz, E. Kemijska tehnika. Ljubljana: Jutro, 1996

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Etanol>, 15. 1. 2016

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Aceton>, 16. 1. 2016

<https://en.wikipedia.org/wiki/Hexane>, 16. 1. 2016

<https://en.wikipedia.org/wiki/Dichloromethane>, 30. 1. 2016

<https://en.wikipedia.org/wiki/Filtration>, 30. 1. 2016

[https://sl.wikipedia.org/wiki/Tankoplastna\\_kromatografija](https://sl.wikipedia.org/wiki/Tankoplastna_kromatografija), 30. 1. 2016

<https://sl.wikipedia.org/wiki/Kromatografija>, 30. 1. 2016

### IZJAVA\*

Mentorica, Mojca DROFENIK ČERČEK, v skladu z 2. in 17. členom Pravilnika raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje, zagotavljam, da je v raziskovalni nalogi naslovom

EKSTRAKCIJA LIMONENA IZ STORŽEV IN SMOLE SMREKE, ANALIZA PRODUKTOV TER OPREDELITEV VPLIVA LUBADARJA NA VSEBNOST LIMONENA, katere avtor je Tomi VAVDI:

- besedilo v tiskani in elektronski obliki istovetno,
- pri raziskovanju uporabljeno gradivo navedeno v seznamu uporabljene literature,
- da je za objavo fotografij v nalogi pridobljeno avtorjevo (-ičino) dovoljenje in je hranjeno v šolskem arhivu;
- da sme Osrednja knjižnica Celje objaviti raziskovalno nalogo v polnem besedilu na spletnih portalih z navedbo, da je raziskovalna naloga nastala v okviru projekta Mladi za Celje,
- da je raziskovalno nalogo dovoljeno uporabiti za izobraževalne in raziskovalne namene s povzemanjem misli, idej, konceptov oziroma besedil iz naloge ob upoštevanju avtorstva in korektnem citiranju,
- da smo seznanjeni z razpisni pogoji projekta Mladi za Celje.

Celje, 14.3.2016



ŠOLSKI CENTER CELJE  
SREDNJA ŠOLA ZA KEMIJO,  
ELEKTROTEHNIKO IN RAČUNALNIŠTVO  
Šola 3000 CELJE, Pot na Lavo 22  
1

Podpis mentorja(-ice)

Podpis odgovorne osebe

### \* POJASNILO

V skladu z 2. in 17. členom Pravilnika raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje je potrebno podpisano izjavo mentorja(-ice) in odgovorne osebe šole vključiti v izvod za knjižnico, dovoljenje za objavo avtorja(-ice) fotografskega gradiva, katerega ni avtor(-ica) raziskovalne naloge, pa hrani šola v svojem arhivu.