



ŠOLSKI CENTER CELJE
Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD IZOLACIJE EVGENOLA IZ KLINČKOV IN ANALIZA PRODUKTOV

RAZISKOVALNA NALOGA

Avtorica:
Ana Slomšek

Mentorica:
Mojca Drogenik Čerček, univ. dipl. inž. kem. tehn.

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2020

Kazalo vsebine

Zahvala.....	6
Povzetek.....	7
Abstract.....	8
1 UVOD.....	9
1.1 Opredelitev ciljev raziskovalnega dela	9
1.2 Hipoteze	9
1.3 Izbira raziskovalnih metod.....	9
2 TEORETIČNI DEL	10
2.1 Rastlinski materiali (droga) in njihova izolacija	10
2.2 Eterična olja	11
2.3 Dišeči klinčevcevec	11
2.4 Evgenol	12
2.5 Teoretične osnove metod	14
2.5.1 Navadna destilacija	14
2.5.2 Destilacija z vodno paro.....	15
2.5.3 Ekstrakcija trdno-tekoče	16
2.5.4 Izolacija z mikrovalovi.....	17
2.5.5 Metoda čiščenja izoliranega produkta.....	20
2.5.6 Analizne metode	20
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	25
3.1 Destilacija z vodno paro.....	25
3.1.1 Inventar	25
3.1.2 Kemikalije.....	25
3.1.3 Postopek.....	26
3.1.4 Meritve in račun.....	28
3.2 Navadna destilacija	28
3.2.1 Inventar	28
3.2.2 Kemikalije.....	28
3.2.3 Postopek.....	29
3.2.4 Meritve in račun.....	29
3.3 Ekstrakcija trdo-tekoče (Soxhlet).....	30
3.3.1 Inventar	30
3.3.2 Kemikalije.....	30

3.3.3	Postopek.....	30
3.3.4	Meritve in račun.....	31
3.4	Maceracija z metanolom.....	31
3.4.1	Inventar.....	31
3.4.2	Kemikalije.....	32
3.4.3	Postopek.....	32
3.4.4	Meritve in račun.....	32
3.5	Izolacija z mikrovalovi.....	33
3.5.1	Inventar.....	33
3.5.2	Kemikalije.....	33
3.5.3	Postopek.....	33
3.6	Analizni postopki.....	34
3.6.1	Tankoplastna kromatografija.....	34
3.6.2	IR spektroskopija.....	36
4	REZULTATI IN KOMENTAR.....	39
4.1	Težave pri procesu raziskovanja.....	43
5	DISKUSIJA.....	45
6	ZAKLJUČEK.....	49
7	VIRI IN LITERATURA.....	50
7.1	Vsebinski viri.....	50
7.2	Viri slik.....	52
	Priloga 1.....	53
	Priloga 2.....	57

Kazalo slik

Slika 1: Dišeči klinčevец in klinčki	12
Slika 2: Aparatura za navadno destilacijo	15
Slika 3: Aparatura za destilacijo z vodno paro	16
Slika 4: Soxhletov aparat.....	17
Slika 5: Ekstrakcija z mikrovalovi.....	18
Slika 6: Primerjava temperaturnih profilov in termalnega obnašanja metode	19
Slika 7: Ionska kondukcija in polarizacija v mikrovalovnem polju.....	20
Slika 8: Reakcija spremembe fenola v ionsko obliko	20
Slika 9: Reakcija prehoda evgenola iz ionske v fenolno obliko	20
Slika 10: Kromatografska komora.....	21
Slika 11: Kromatogram z izračunom Rf	22
Slika 12: Nihanje atomov v molekuli.....	22
Slika 13: Območja absorpcijskih trakov posameznih tipov vezi.....	23
Slika 14: IR spektrometer	24
Slika 15: IR spektrometer	24
Slika 16: Destilacija z vodno paro.....	26
Slika 17: Ekstrakcija v organsko topilo	27
Slika 18: Organska faza	27
Slika 19: Fenolat (lij ločnik št. 3, desno)	27
Slika 22: Ekstrakcija s CH ₂ Cl ₂	27
Slika 20: Stresanje z NaOH	27
Slika 21: Nakisanje	27
Slika 23: Navadna destilacija.....	29
Slika 24: Ekstrakcija po Soxhletu.....	31
Slika 25: Stresanje vzorca.....	31
Slika 26: Produkt po stresanju.....	31
Slika 27: Filtracija.....	31
Slika 28: Odparevanje topila	32
Slika 29: Filtracija s syringa filtri.....	31
Slika 30: Vzorci različnih stopenj postopka	34
Slika 31: Razvijanje kromatograma	35
Slika 32: Kromatogram vzorcev pod UV svetlobo.....	34
Slika 33: Kromatogram vzorcev izolacije z mikrovalovi	36
Slika 34: Bruker FTIR Alpha Platinum spektrometer	36
Slika 35: Kromatogram vzorcev prvih štirih metod in standarda	40
Slika 36: Kromatogram neuspele in uspele izolacije z mikrovalovi.....	40
Slika 37: Adicija broma na dvojno vez.....	48
Slika 38: Oksidacija alkena	48

Kazalo tabel

Tabela 1: Lastnosti evgenola.....	13
Tabela 2: Vsebnost evgenola v začimbah	13
Tabela 3: Inventar za parno destilacijo	25
Tabela 4: Inventar za kislinsko-bazno ekstrakcijo	25
Tabela 5: Kemikalije za izolacijo s parno destilacijo.....	25
Tabela 6: Inventar za navadno destilacijo.....	28
Tabela 7: Kemikalije za izolacijo z navadno destilacijo	29
Tabela 8: Inventar za ekstrakcijo trdno-tekoče po Soxhletu	30
Tabela 9: Kemikalije za ekstrakcijo po Soxhletu	30
Tabela 10: Inventar za ekstrakcijo trdno-tekoče z maceracijo	31
Tabela 11: Kemikalije za maceracijo	32
Tabela 12: Inventar za izolacijo z mikrovalovi.....	33
Tabela 13: Kemikalije za izolacijo z mikrovalovi.....	33
Tabela 14: Inventar za tankoplastno kromatografijo.....	34
Tabela 15: Kemikalije za identifikacijo produktov	34
Tabela 16: Retencijski faktorji vzorcev.....	35
Tabela 17: Retencijski faktor izolacije z mikrovalovi.....	35
Tabela 18: Izkoristki metod.....	39

Kazalo enačb

Enačba 1: Plinski zakon	15
Enačba 2: Izračun skupnega tlaka	15
Enačba 3: Izračun retencijskega faktorja	21
Enačba 4: Izračun valovnega števila.....	23
Enačba 5: Izračun izkoristka	28
Enačba 6: Izračun retencijskega faktorja	35

Zahvala

Največja zahvala gre seveda mentorici prof. Mojci Drofenik Čerček za vso pomoč pri načrtovanju in izvedbi dela, iskanju literature ter še posebej za neprestano spodbudo in vztrajnost, ko stvari niso potekale po načrtu.

Posebna zahvala gre poleg gospe mentor tudi njeni hčeri, ki mi je omogočila izvedbo infrardeče spektroskopije na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim profesorjem in laborantkama kemijskega kabineta Srednje šole za kemijo, elektrotehniko in računalništvo, ki so poskušali z nasveti in vzpodbudo uresničiti moje zamišljene cilje za to raziskovalno delo.

Zahvala gre gospe dr. Aniti Laznik in prof. Rosani Breznik za lektorstvo in ne nazadnje Šolskemu centru Celje, kjer sem lahko izvedla praktično delo.

Za konec pa se zahvaljujem tudi družini in prijateljem, ki so me podpirali in mi stali ob strani tekom raziskovanja.

Povzetek

Evgenol predstavlja pomembno, največkrat iz klinčkov izolirano, aromatsko spojino. Njegova uporaba se razteza vse od prehrabene industrije pa do parfumerije, medicine in farmacije. Ima številne pozitivne učinke na človeško telo, predvsem zaradi svojega antioksidativnega delovanja. Njegov potencial za nadaljnje raziskave in uporabo je izjemen.

V tej raziskovalni nalogi sem z različnimi načini (parno destilacijo, navadno destilacijo, maceracijo, ekstrakcijo po Soxhletu, izolacijo z mikrovalovi) izolirala evgenol iz klinčkov in analizirala dobljene produkte s tankoplastno kromatografijo in IR spektroskopijo. Posebna pozornost je bila usmerjena v novejšo metodo izolacije s pomočjo mikrovalov. Uspešno je bila prilagojena in izvedena alternativna metoda z gospodinjsko mikrovalovno pečico.

Produkt je bil z vsemi metodami uspešno pridobljen, kakovost, količina in izkoristki pa so se precej razlikovali. Dokazano je bilo dejstvo, da je za izolacijo najbolj primerna parna destilacija. Izkoristek je pri vseh metodah drugotnega pomena zaradi slabše kakovosti produktov z višjim izkoristkom.

Ključne besede: klinčki, evgenol, izolacija, parna destilacija, navadna destilacija, ekstrakcija trdnotekoče, izolacija z mikrovalovi, tankoplastna kromatografija, IR spektroskopija

Abstract

Eugenol is an important aromatic compound, that is mostly isolated from cloves. Its use extends from the food industry to perfumery, medicine and pharmacy. It has many positive effects on the human body, mainly due to its antioxidant activity. It has great potential for further research and application.

In this research assignment, I have isolated eugenol from cloves using various methods (steam distillation, ordinary distillation, maceration, Soxhlet extraction, microwave isolation) and analysed the obtained products by thin-layer chromatography and IR spectroscopy. Particular attention was paid to newer method of microwave isolation. An alternative method with a household microwave oven was successfully adapted and implemented.

The product was successfully obtained by all methods but the quality, quantity and efficiency varied considerably. It has been proven that steam distillation is most suitable for isolation. Efficiency is of secondary importance for all methods, due to lower quality of the products with higher efficiency.

Key words: clove, eugenol, isolation, steam distillation, distillation, extraction, microwave extraction, thin-layer chromatography, IR Spectroscopy

1 UVOD

Biološko pomembne spojine so del našega vsakdana, a velikokrat se ne zavedamo, da je morda del nekaj tako preprostega, kot je strok vanilije, klinček ali cvet kamilice v resnici kompleksna organska spojina. Spojina, ki je primerna za takojšnja uporaba, pomembna za nadaljnje reakcije in proizvodnjo novih produktov. Tako so začimbe na primer res vir naravnih spojin z vonjem in okusom, vendar njihova uporaba sega precej dlje od prehranske industrije. V svojem delu se bom zato posvetila izolaciji spojine evgenola iz klinčkov. Spojino zelo pogosto najdemo v svojem vsakdanjem življenju in ima mnoge pozitivne lastnosti ter izredno koristne možnosti nadaljnje uporabe, ki pa se jih večinoma ne zavedamo.

1.1 Opredelitev ciljev raziskovalnega dela

Odločila sem se, da želim v svoji raziskavi nekaj preprostega, kot so klinčki, razkriti kot nekaj več kot le začimbo. Iz le-teh bom izolirala zeleni produkt, v nadaljevanju pa ga po potrebi ekstrahirala v organsko topilo, izvedla kislinsko–bazno ekstrakcijo in analizirala končni produkt. Dišeči klinčevец se uporablja v prehranski, kozmetični, parfumski industriji in zobozdravstvu, kar dokazuje širok spekter njegove uporabnosti, njegovo učinkovitost in nepogrešljivost v vsakdanjem življenju. Iz eteričnega olja pa je nato možna izolacija evgenola, spojine z antiseptičnim, lokalno anestetičnim in antioksidativnim delovanjem. Posledično se uporaba razširi v medicino in farmacevtsko industrijo. Zaradi vseh njegovih pozitivnih možnosti uporabe želim spoznati, kako lahko iz začetne snovi izoliramo čim več in čim bolj kakovosten produkt, kar bom dosegla z izvedbo več različnih metod pridobivanja eteričnega olja oziroma ekstrakta. Z analizami produktov ter opažanji pred samim pridobivanjem in med njim bom skušala določiti, katera metoda je najboljša za izolacijo evgenola (metoda z največjim izkoristkom, najbolj preprosta, najmanj okolju škodljiva, najhitrejša ...). Še posebej pa se želim posvetiti novi metodi ekstrakcije, in sicer ekstrakciji z mikrovalovi, ki velja za metodo sodobnosti in prihodnosti.

1.2 Hipoteze

Pred začetkom dela sem si postavile nekatere hipoteze, ki jih bom po koncu dela potrdila ali ovrgla in me bodo vodile skozi raziskovanje.

1. HIPOTEZA: Evgenol predstavlja spojino, pomembno za pridobivanje novih produktov, velike so možnosti nadaljevanja raziskav na področju medicine in farmacije.
2. HIPOTEZA: Največji izkoristek in najčistejši produkt pridobimo s parno destilacijo.
3. HIPOTEZA: Izolacija evgenola iz klinčkov je možna z gospodinjsko mikrovalovno pečico. Proces je hiter, končni produkt kvaliteten.

1.3 Izbira raziskovalnih metod

Najprej sem se osredotočila na analizo literature, ki jo je o tej tematiki možno najti. Sledil je eksperimentalni del v obliki laboratorijskega dela in kemijskih analiz. Izvedla sem pet različnih načinov izolacije evgenola iz klinčkov, in sicer navadno destilacijo, destilacijo z vodno paro, maceracijo, ekstrakcijo po Soxhletu in ekstrakcijo z mikrovalovi. Sledila je analiza pridobljenih rezultatov, povezuje le-teh s teoretično pridobljenim znanjem, njihova primerjava in vrednotenje.

2 TEORETIČNI DEL

V tem delu raziskovalne naloge so predstavljene teoretične osnove o začetni snovi, končnem produktu, metodah dela in analizi produktov.

2.1 Rastlinski materiali (droga) in njihova izolacija

Rastlinske snovi, ki jih v Evropski farmakopeji¹ enačimo z rastlinskimi drogami, so lahko cele, razdrobljene ali razrezane rastline in njihovi deli, prav tako tudi alge, glive in lišaji v neobdelanem stanju. Material je lahko posušen ali svež, odvisno od tega, za kaj je material potreben in kakšne so njegove značilnosti. Razlog, zakaj se sploh ukvarjamo s proučevanjem rastlinskega materiala, je dejstvo, da v številnih najdemo zdravilne učinkovine, ki so dobrodošle snovi za naše zdravje in dobro počutje. Pomembno je, da se zavedamo, kaj želimo iz tega rastlinskega materiala izolirati in imamo primerno predznanje o lastnostih te snovi, saj lahko z uporabo napačne metode izolacije uničimo želen produkt ali pa ga niti ne uspemo pridobiti. Omenjene metode izolacije oz. postopki, s katerimi je možno pridobiti neko snov iz rastlinskega materiala, so na primer ekstrakcija, ekstrakcija s superkritičnimi fluidi, različne vrste destilacije, enfleraža, stiskanje, fermentacija idr.

Enfleraža je tradicionalna metoda, ki se izvaja ročno, zato je tudi zelo cenjena, draga in redko uporabljena. Takšna metoda je potrebna za zelo občutljive cvetove, pri katerih destilacija ni več možna. Te cvetove položijo na ploščo, premazano s prečiščeno maščobo, kjer jih pustijo 24 ur in postopek ponovijo 36-krat. Končni produkt se imenuje pomada, kar so v bistvu cvetovi z maščobo, iz katerih nato s pomočjo etanolne ekstrakcije dobimo produkt, imenovan absolut.

Ekstrakcija je kemijska metoda, s pomočjo katere izlužimo snovi iz trdne zmesi ali tekočine in se najobičajneje uporablja za izolacijo in čiščenje organskih spojin z različnimi kemijsko-fizikalnimi lastnostmi in izolacijo lipofilnih ter temperaturno občutljivih snovi, kot so na primer eterična olja. Primarno ločimo dve vrsti ekstrakcije: ekstrakcijo trdno-tekoče (snov iz katere ekstrahiramo je v trdnem agregatnem stanju, topilo v tekočem) in tekoče-tekoče (snovi sta v tekočem agregatnem stanju). Produkti, ki jih pridobimo s pomočjo ekstrakcije, so lahko v različnih stanjih (tekoči ali trdni).

Ekstrakcija z organskimi topili je primerna za termolabilne (slabo obstojne ali neobstoje pri višjih temperaturah) organske materiale, ki ne dajejo eteričnega olja. Dobimo vmesni produkt, imenovan konkret, ki ga nato dodatno obdelamo z etanolno ekstrakcijo in uparimo topilo, da dobimo absolut.

Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi je sodobna metoda, ki je primerna za vse vrste rastlinskih materialov, za katero nam že ime pove, da se izvaja s superkritičnimi fluidi, kot je npr. CO₂. Produkt je t.i. superkritični izvleček, za katerega je značilna visoka kakovost, saj ne vsebuje nobenih topil, poleg tega pa je primerna tudi za na visoko temperaturo občutljive snovi, saj je temperatura ekstrakcije nizka.

Destilacija z vodno paro je daleč najbolj uporabljena metoda, saj je preprosta, cenovno dostopna in primerna za temperaturno občutljive organske spojine. S takšno metodo kot končni produkt pridobimo eterično olje in aromatično vodo oziroma hidrolat, ki se med seboj ne mešata, zato je njuna ločitev preprosta. Poznamo tudi navadno destilacijo, katere uporaba je večkrat otežena, saj ni najbolj primerna za snovi občutljive na višje temperature. [6, 28]

¹ Farmakopeja je publikacija, ki vsebuje navadno zakonsko obvezujoče predpise za razvoj, izdelavo in preizkušanje kakovosti zdravil in njihovih sestavin ter druge podatke o zdravilih ter njihovi uporabi.

2.2 Eterična olja

Kot produkt, ki ga dobimo z izolacijo neke spojine iz rastlinskega materiala, velikokrat dobimo tudi eterična olja, snovi prijetne arome in okusa. Mnogokrat jih vsebujejo začimbnice. Eterična olja so pogosto kompleksne zmesi spojin, dišeče oz. aromatične komponente, v njih pa največkrat predstavljajo estri, aromatski aldehidi in ketoni. Takšne spojine so na primer evgenol (klinčki), vanilin (vanilijevi stroki), anetol (janež) in cimetaldehid (cimet).

Eterična olja so lipofilne tekočine (v maščobah topne tekočine), ki so zelo težko oziroma netopne v vodi. Njihove lastnosti so gostota, manjša od vode, izrazita aroma in okus, pogosto so občutljive na svetlobo ali toploto, kar zahteva ustrezno shranjevanje. Količina in sestava eteričnih olj je odvisna od več okoljskih faktorjev, kot je nahajališče, rast in način pobiranja rastline in seveda od načina izvedbe izolacije. Eterična olja imajo širok spekter uporabe, in sicer kot dodatek v hrani (flavoranti), kozmetiki (deodoranti, parfumi) in farmaciji.

Eterična olja po navadi izoliramo iz rastlinskih delov z destilacijo z vodno paro. Nekatera eterična olja pa pri pogojih destilacije z vodno paro niso obstojna, zato jih izoliramo z ekstrakcijo z nepolarnimi organskimi topili (npr. heksan, kloroform) ali s superkritičnim ogljikovim dioksidom. Tudi spojine, ki so v vodi topne ali pa so občutljive na hidrolizo, ne moremo izolirati z destilacijo z vodno paro. [28]

2.3 Dišeči klinčevca

Nageljnovi žbice oziroma klinčki so posušeni cvetni popki rastline dišečega klinčevca (*Syzygium aromaticum*) (slika 1), ki izvira iz Moluških otokov, Indonezije. Ti so prav zaradi značilnosti te začimbe – močne dišeče arome – dobili ime Dišavni otoki. Klinčevca je zimzeleno drevo, ki spada v družino mirtovk. Zraste do 20 metrov, njegovi listi so usnjati, dolgi približno 15 cm, njegovi plodovi oziroma uporabni del pa so močno dišeči cvetovi. Cvetni popki se sušijo določeno časovno obdobje (domačini jih sušijo tri dni) in po sušenju dobijo videz, ki nam je poznan (rjavi trdi plodovi z zvezdasto razraščeno glavo). Prav zaradi svojega videza, ki spominja na starinski žebelj, so dobili svoje drugo ime nageljnovi žbice (beseda nagelj v imenu nima nobene povezave z istoimensko rastlino). Cvetovi in posledično tudi klinčki se začnejo razvijati 4 leta po nasaditvi. Klinčki skupaj z muškatnim oreščkom in cimetom spadajo med najstarejše začimbe, saj klinčke omenjajo že v starih kitajskih zapisih v tretjem stoletju pred našim štetjem. Skupaj z drugimi začimbami so jih najprej prinašali v Evropo trgovci – muslimani z Vzhoda. Tako so bili klinčki dobro poznani in seveda zelo dragi že v času Rimskega imperija. V 16. in 17. stoletju so z njimi trgovali najprej Portugalci, kasneje pa Nizozemci in Španci. Visoka cena te začimbe pa ni le posledica majhne pridelave, ampak je veljala za eno izmed najdragocenejših začimb, saj se je dolga stoletja uporabljala kot konzervans in v terapevtske namene. Zaradi trgovine z začimbami so nastali razni spori in celo vojne, kasneje pa jim je uspelo začeti vzgajati rastlino tudi na drugih otokih, začelo se je gojenje na plantažah in zahvaljujoč temu so cene te začimbe drastično padle. Danes se rastlina vzgaja na različnih koncih sveta in se lahko na hektarju zemlje pridelata do približno 300 kg nageljnovih žbic. Klinčki, tako celi kot tudi zmleti, so priljubljena začimba v domačih kuhinjah pri pripravi mesnih jedi in izdelkov, sladici, celo vročih pijač, kot je na primer kuhano vino.

Nageljnovi žbice vsebujejo relativno veliko količino eteričnega olja (15–20 %), ki je v večinskem delu sestavljen iz spojine, imenovane evgenol, ki je precej razširjena in uporabna substanca v vsakdanjem življenju. [16, 26, 28]



Slika 1: Dišeči klinčevец in klinčki

2.4 Evgenol

Evgenol je svetlo rumena do brezbarvna razmeroma viskozna oljnata tekočina, ki se v največjem delu nahaja v eteričnem olju klinčkov (najdemo jo tudi v cimetu, lovorju, baziliki in muškarnem oreščku). Težavo pri pridobivanju evgenola neposredno iz nageljnovih žbic predstavljajo predvsem visoki stroški pridelave in dolgotrajen proces ekstrakcije. Ime je dobil po latinskem imenu rastline (*Eugenia aromatica* ali *Eugenia caryophyllata*, s sodobnejšim imenom *Syzygium aromaticum*) in je glavna sestavina iz njih pridobljenega eteričnega olja. Olje posušenih popkov vsebuje od 60 pa vse do 95 % evgenola, ostale sestavine eteričnega olja klinčkov pa so tudi evgenilacetat (2–15 %), furfural, metil n-amil keton, β -kariofilen (5–10 %), metil salicilat in ostalo. Zaradi svoje izrazite arome je spojina dobila poimenovanje aromatska spojina, enako kot tudi vanilin in anetol. Zanj je značilen tudi poseben, rahlo pekoč okus. [28]

Za osnovo so v tabeli 1 predstavljene nekatere lastnosti spojine evgenol [14].

Tabela 1: Lastnosti evgenola

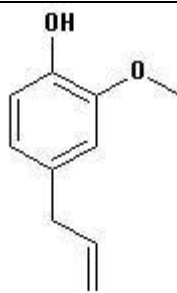
Ime po IUPAC-u	1-hidroksi-2-metoksi-4 propenilbenzen 4-metoksi-2-aliifenol
Molekulska formula	C₁₀H₁₂O₂
Molska masa	164,2 g/mol
Temperatura tališča	-9,2 – -9,1 °C
Temperatura vrelišča	254 °C
Gostota	1,064 – 1,068 g/mL
Topnost	netopen v vodi, topen v alkoholu in maščobah
Opis spojine	brezbarvna ali blede rumena oljnata spojina, izrazita aroma, na zraku potemni
Delovanje	antiseptične, analgetične, protivnetne, antioksidativne lastnosti
Nevarnost in toksičnost	koži dražljivo, LD₅₀ (podgane) = 1930 mg/kg telesne teže
Strukturna formula	

Tabela 2 predstavlja vsebnost evgenola v nekaterih začimbnicah. [17]

Tabela 2: Vsebnost evgenola v začimbah

Rastlina	Del rastline	Koncentracija evgenola [mg evgenola/ g začimbnice]
klinčevce	cvet in popki	180
cimet	lubje	3,52
bazilika	listi	4,2-4,97
muškadni orešček	semena	0,32
timijan	poganjki	0,021

Evgenol se uporablja v parfumi, predvsem orientalskih dišavah, pogosta je uporaba v prehrabeni industriji, uporablja pa se tudi kot lokalni antiseptik, saj ima kot vsi fenoli močno antiseptično delovanje (izdelki za čiščenje ustne votline – zobne paste in ustne vodice) in anestetik (tudi kot anestetik za ribe, preden jim odvzamejo tkiva za različne raziskave in kot humana metoda za evtanazijo bolnih akvarijskih rib). Evgenol je bil uporabljen kot izhodna spojina pri prvi komercialni sintezi vanilina. Eterično olje klinčkov je najbogatejši vir fenolnih sestavin oziroma evgenola, ki mu je poleg tega, da se uporablja v farmacevtski, kozmetični, prehrabeni industriji in kmetijstvu, v več študijah dokazano tudi protimikrobno in antioksidativno delovanje (v plastikah in gumah). Protimikrobno delovanje je bilo dokazano s študijo na patogenih, izoliranih iz banan, in na 25 različnih bakterijah, saj je eterično olje klinčkov delovalo izrazito inhibitorno na rast bakterij. Antioksidativno delovanje so

dokazali s študijo, pri kateri je ekstrakt cvetov dišečega klinčevca (večinski del ekstrakta predstavlja evgenol) inhibiral (zaviral) oksidacijo heksanala. [28]

Evgenol je izjemno pomembna snov za zdravje ljudi. Poleg svojega antioksidativnega in antimikrobnega delovanja ima tudi protivnetno funkcijo, deluje proti rakavim celicam, ima dokazane protistresne učinke, varuje živčne celice in ima protidiabetični potencial. Pri vsem tem ima najpomembnejšo vlogo ravno antioksidativno delovanje evgenola, saj so mnoge bolezni, kot npr. rak, sladkorna bolezen, artritis, Parkinsonova bolezen in Alzheimerjeva bolezen, izzvane in nato razširjene zaradi odvečne skupine prostih radikalov. Antioksidativna moč evgenola se kaže v tem, da tvori komplekse in s tem preprečuje negativno delovanje prostih radikalov na telo. Informacije so zelo okrnjeno odvzete iz članka Royal Society of Chemistry, ki so ga napisali, raziskali in dokazali raziskovalci iz Pakistana v sodelovanju z Združenimi državami Amerike. [17]

2.5 Teoretične osnove metod

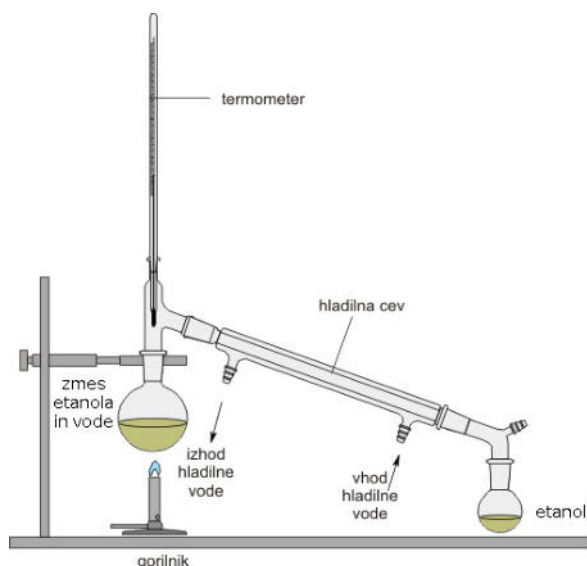
Izraz izolacija v kemiji razumemo kot proces osamitve neke spojine iz zmesi, v kateri se nahaja. To je lahko neka reakcijska zmes ali pa biološki material, kot je na primer rastlinsko tkivo. Izolacija lahko poteče na osnovi razlik v kemijskih ali fizikalnih lastnostih, kot so agregatno stanje, vrelišče, hlapnost, razlike v topnosti idr. Pomembno je, da za ločevanje komponente od zmesi izberemo pravilno separacijsko tehniko, pri čemer moramo upoštevati lastnosti želenega produkta. Največkrat se primarno uporablja ekstrakcija iz neke trdne matrice, kar lahko predstavlja že prelitje z vročim topilom (priprava čaja ali kave), večkrat pa so potrebni daljši in kompleksnejši postopki. Potrebno je izbrati za delo primerno topilo, ki dobro raztaplja želeno snov in je dovolj hlapno, da je možno uparjevanje. Za izolacijo eteričnih olj je najbolj primeren in najpogosteje uporabljen postopek izolacije destilacija z vodno paro. Za določanje uspešnosti izolacijskih tehnik uporabljamo identifikacijske metode. [5]

Tekom eksperimentalnega dela izvedemo različne metode izolacije, čiščenja in identifikacije, ki so esencialen del celotne raziskovalne naloge. V tem delu so opisane njihove teoretične osnove.

2.5.1 Navadna destilacija

Destilacija je način termičnega ločevanja tekočinskih zmesi na osnovi različnega parnega tlaka oziroma vrelišča posameznih komponent. Za uspešno destilacijo se morata vrelišči komponent razlikovati za najmanj 10 °C. Poznamo več vrst destilacije, pri vsaki od njih pa tekočino zavremo in uparimo, nastale pare pa vodimo v hladilnik, kjer se utekočinijo in dobimo destilat. Ohladitev in utekočinjanje par imenujemo kondenzacija, zato končni produkt imenujemo tudi kondenzat. Navadno destilacijo izvajamo v aparaturi, prikazani na sliki 2, ki je sestavljena iz bučke, destilacijskega nastavka in hladilnika. Na koncu hladilnika lahko namestimo še podaljšek, ki omogoča tudi pritrditev predloške.

Navadno destilacijo uporabljamo predvsem pri izdelavi žganih pijač, alkoholnih pijač z večjim deležem alkohola. Pijače, ki nastanejo s fermentacijo (vino, pivo), vsebujejo namreč največ 15 % alkohola, z destilacijo pa dobimo žgane alkoholne pijače, ki vsebujejo večji delež alkohola. Posebno vrsto destilacije uporabljajo v rafinerijah, kjer iz surove nafte pridobivajo različne naftne derivate npr. kerozin, bencin, parafin ... Ta vrsta destilacije se imenuje frakcionirna destilacija. Navadna destilacija pa predvidoma ni najbolj primerna za delo z organskimi spojinami, ki so občutljive na višje temperature oz. so temperaturno nestabilne. [3]



Slika 2: Aparatura za navadno destilacijo

2.5.2 Destilacija z vodno paro

Z destilacijo z vodno paro destiliramo zmesi, ki se ne mešajo z vodo. Uporabljamo jo za destilacijo organskih substanc, ki se v vodi ne topijo in ne razpadejo pri temperaturi do 100 °C.

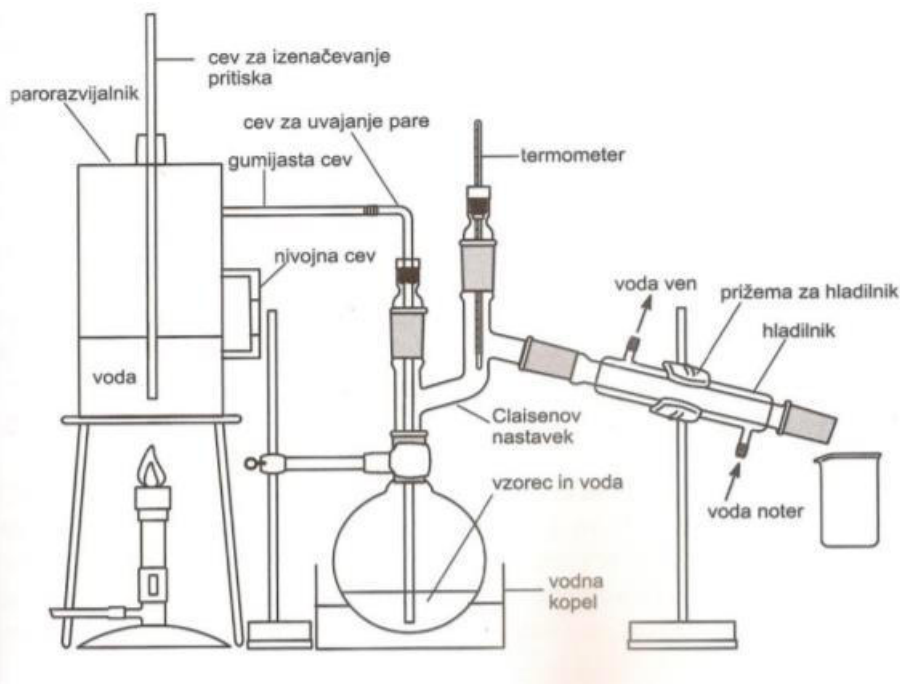
Za parno fazo nad zmesjo veljajo plinski zakoni: razmerje množin posameznih snovi je enako razmerju njihovih parnih tlakov, skupni tlak pa vsota parcialnih tlakov. Zaradi teh zakonitosti tekočinska zmes zavre pri nižji temperaturi, kot sta vrelišči posameznih komponent. Ker je ena komponenta voda, bo zmes zavrela pod 100 °C.

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{p_1^*}{p_2^*} \quad \text{Enačba 1: Plinski zakon}$$

$$p = p_1^* + p_2^* \quad \text{Enačba 2: Izračun skupnega tlaka}$$

Rastlinsko drogo po navadi izoliramo z destilacijo z vodno paro. Vodna para zajame drogo in jo s sabo odnese s tokom, ki hlapi. V posodi, kjer zbiramo eterično olje in aromatično vodo, se ločita, saj se med sabo ne raztapljata. Z lijem ločnikom preprosto ločimo komponenti, ki se ne mešata in eterično olje shranimo v temni steklenici pri sobni temperaturi.

Na sliki 3 je prikazana aparatura za destilacijo z vodno paro, ki se od aparature za navadno destilacijo razlikuje po tem, da rastlinske dele v bučki ne segrevamo direktno, ampak tako, da nanje uvajamo vodno paro, ki nastaja v parorazvijalcu. [3]



Slika 3: Aparatura za destilacijo z vodno paro

2.5.3 Ekstrakcija trdno-tekoče

Ekstrakcija je postopek, s katerim odstranjujemo iz trdnih snovi ali raztopin topne komponente s topilom. Kadar ekstrahiramo substance iz raztopin, govorimo o ekstrakciji tekoče-tekoče, kadar pa ekstrahiramo substance iz trdnih snovi, pa o ekstrakciji trdno-tekoče.

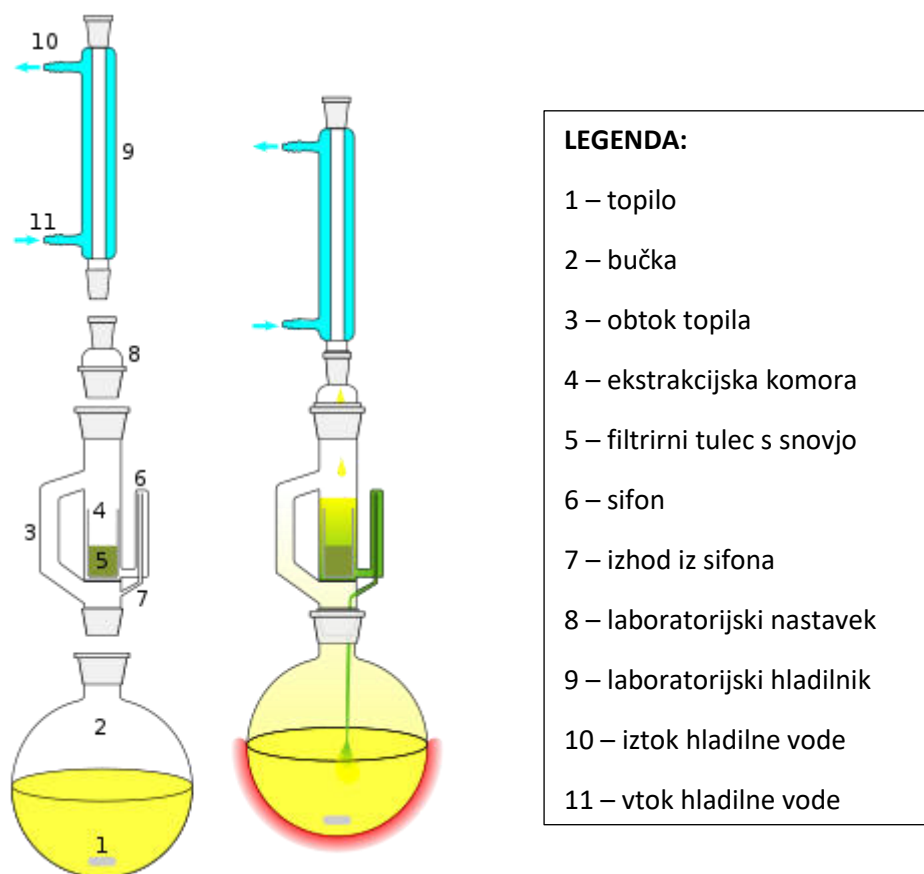
Pri ekstrakciji trdno-tekoče je zaželeno, da trdno snov pred ekstrakcijo zdrobimo, zmeljemo oz. stremo, saj s tem povečamo površino, na katero deluje topilo in so izkoristki ekstrakcij višji in proces teče hitreje. Potrebno je biti posebej pozoren pri izbiri topila, saj mora biti snov, ki jo želimo iz nekega materiala izolirati, dobro topna v le-tem.

Po ekstrakciji sledi po navadi še uparjanje, pri čemer koncentriramo dobljeno raztopino tako, da odstranimo topilo. Uparjanje je metoda za ločevanje raztopin, sestavljenih iz topila in trdnih snovi v njem. Parni tlak trdne snovi je zanemarljiv. Raztopino segrejemo do vrelišča in segrevamo določen čas, da večina topila odpari. Ločimo več različnih vrst uparjevanja, vsem pa je skupno to, da tekočino zavremo, uparimo in pare vodimo v hladilnik, kjer kondenzirajo. V bučki nato ostane koncentrirana raztopina topljenca ali suh produkt. Ena iz med vrst uparjevanja je uparjevanje pri znižanem tlaku t.i. vakuumsko uparjevanje, ker je pri teh pogojih temperatura vrelišča zmesi nižja (organske substance so občutljive na visoke temperature). [6]

2.5.3.1 Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom

Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom sodi pod ekstrakcijo trdno-tekoče. Soxhletov aparat (slika 4) je naprava, sestavljena iz destilacijske bučke, ekstrakcijske komore in hladilnika. V aparaturu oz. destilacijsko bučko nalijemo neko določeno topilo, trdna snov, ki jo želimo ekstrahirati, pa se nahaja v tulcu iz filtrirnega papirja, pokritega z vato. Vata prepreči uhajanje trdne snovi, ki bi jo lahko topilo zaradi majhne mase odneslo. Topilo v napravi kontinuirno kroži in pri tem oblika trdno snov v tulcu in ekstrahira želena snov. Pri temperaturi vrelišča topila pare potujejo v hladilnik, kjer kondenzirajo, in kondenzat steče na tulec. Ko v ekstrakcijsko komoro, kjer se nahaja tulec, kondenzira dovolj topila in

doseže višino obtoka, steče raztopina nazaj v bučko spodaj. Takšen pretok se ponovi večkrat in večje, kot je število pretokov, bolj koncentrirana je raztopina v bučki. Ekstrakcijo zaključimo po pretečenem določenem času ali se pri neznanem podatku pri delu zanašamo na lasten čas, ki ga določimo glede na hitrost pretokov, ki jo opazimo. Ko odstranimo filtrirni tulec iz ekstrakcijske komore, se ekstrakcija zaključi in dobljeni ekstrakt je pripravljen na nadaljnjo obdelavo, po navadi uparjanje topila pod znižanim tlakom.



Slika 4: Soxhletov aparat

2.5.3.2 Maceracija

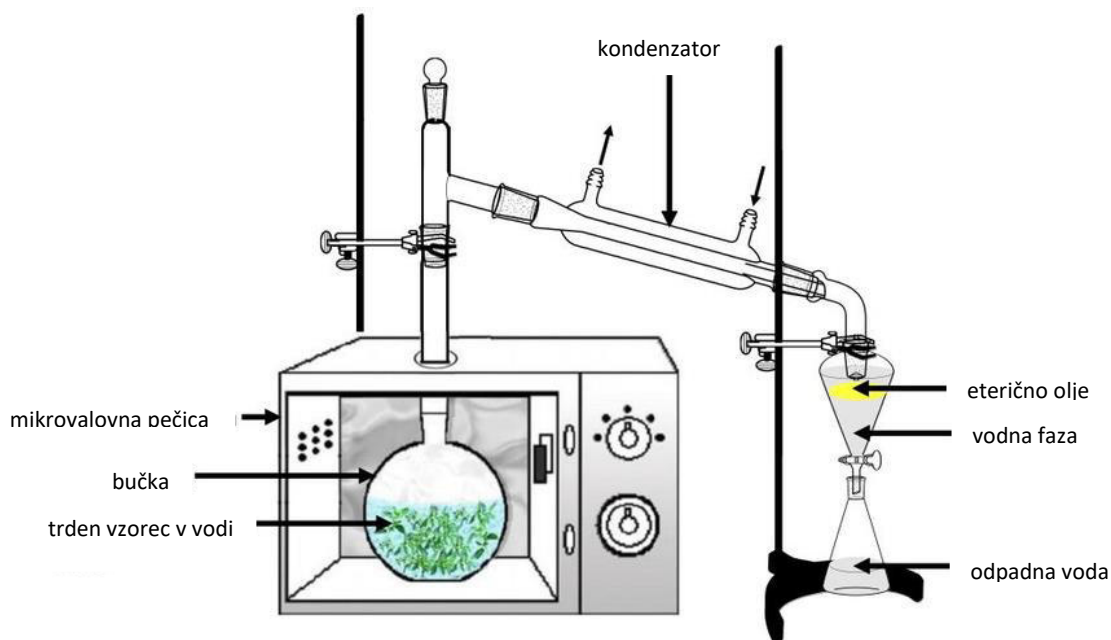
Je prav tako vrsta ekstrakcije trdno-tekoče, pri čemer neko prej obdelano ali neobdelano trdno snov prelijemo s topilom. V nadaljevanju, odvisno od snovi, ki jo želimo ekstrahirati, uporabimo različne postopke. To je po navadi mešanje različno časovno obdobje in/ali segrevanje. Po tem sledi čiščenje produkta s filtracijo in uparjanje topila.

2.5.4 Izolacija z mikrovalovi

Izolacija eteričnih olj iz rastlinskega materiala je danes povsem vsakdanji postopek v laboratorijih in skozi čas so se razvile številne tehnike in napredek je viden v sodobnih postopkih in novih napravah. Najpogostejši postopek pridobivanja zelene komponente iz rastline je destilacija z vodno paro, ki pa ima svoje slabosti, največjo predstavlja velika poraba časa. Poleg tega je potrebnega precej vzorca za pridobitev zelo majhne količine produkta, poraba energije pa je zaradi stalnega segrevanja precej velika. Zato so želeli razviti alternativni postopek, ki bo omogočil hitrejšo in morda tudi boljše izolacijo zelenega produkta. Tako se je razvil MAE sistem (*microwave-assisted extraction*). Ekstrakcija s pomočjo mikrovalov je proces uporabe energije mikrovalov za segrevanje topila z vzorcem, z

namenom odcepiti in prenesti snovi iz vzorca v topilo. Ekstrakcija s pomočjo mikrovalov je veliko bolj energetska učinkovita, kratkotrajna (10–30 minut), zahteva manj topila in manj samega materiala, iz katerega želimo neko snov izolirati.

Na sliki 5 je modificirana mikrovalovna naprava za ekstrakcijo skupaj s sočasnim destilacijskim sistemom za ločevanje produkta.

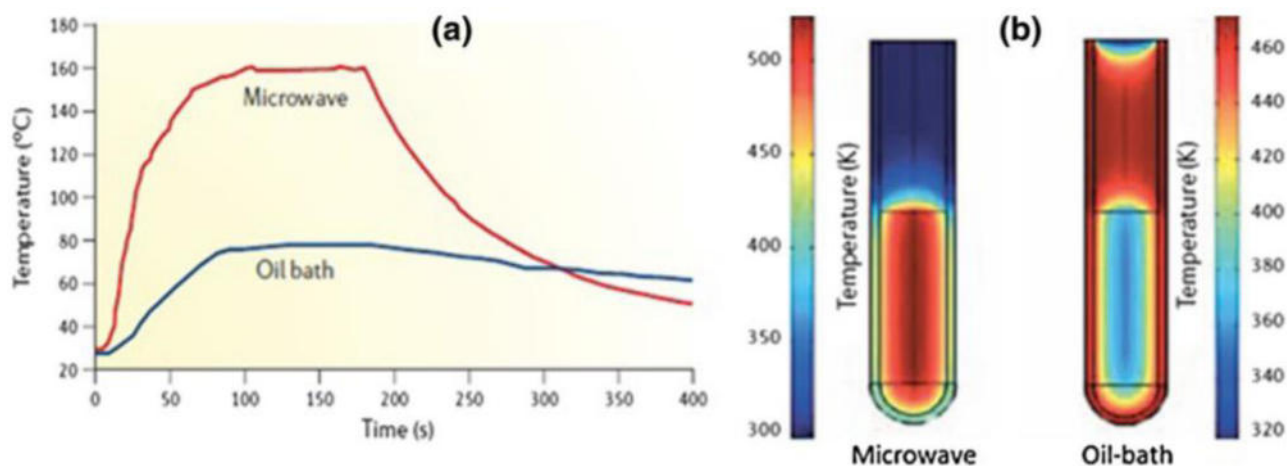


Slika 5: Ekstrakcija z mikrovalovi

Zaradi potreb po alternativnih metodah (učinkovitejših, hitrejših, z manjšo zahtevo po topilu idr.) so se v zadnjih letih razvile številne metode. Največkrat omenjene so izolacija z mikrovalovi MAE, ekstrakcija s superkritičnimi fluidi SFE (str. 9) in ekstrakcija pod visokim tlakom PLE (pressurised liquid extraction). Vsem trem je skupno delovanje pri višjih temperaturah oz. tlaku, kar drastično pospeši proces ekstrakcije.

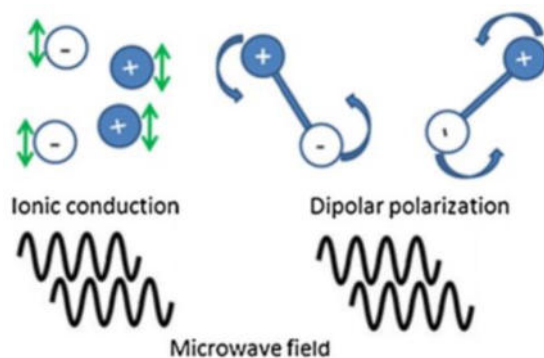
Že pred desetletji so se znanstveniki zavedali izjemnega potenciala energije mikrovalov, a so se prvič pojavili v laboratorijih šele leta 1975, ko so z njihovo pomočjo raziskovalec Abu-Samri in drugi opravljali analizo kovin v bioloških materialih. Uporaba se je razširila na področja biologije, geologije, kovinarstva, ekologije in nadomestila številne procese, kjer je bilo prej potrebno segrevanje z vročimi ploščami ali gorilnikom. Leta 1986 pa so tehnologije, podprte z mikrovalovi, prevzele pomembnejše vloge. Prvič so jih uporabili za ekstrakcijo določenih maščob in antinutrientov iz hrane ter pesticidov iz zemlje. Ekstrakcijo so izvedli v gospodinjski mikrovalovni pečici, uporabili so od 0,5 do 1 g vzorca v 2 do 3 mL topila. Ekstrakcija je potekala le 5 minut, rezultate pa so lahko primerjali s tistimi, ki so jih pridobili iz kompleksnejših analiz. Environment Canada je razvila proces ekstrakcije z mikrovalovi, ki se je uporabljala predvsem za ekstrakcijo substanc iz bioloških materialov. To metodo so leta 1991 prvič uporabili za ekstrakcijo eteričnih olj iz rastlin. Po 90. letu so se pričele številne raziskave, kjer so začeli gospodinjske mikrovalovne pečice prilagajati uporabi v laboratoriju. Raziskovali so ekstrakcijske parametre, kot so izbira topil, vlaga, ekstrakcijski čas idr. Mikrovalove so začeli uporabljati za ekstrakcijo atrazina iz zemlje in vode, vitaminov iz vzorcev hrane ipd. Danes so metode z uporabo mikrovalov napredne in pogoste v analitskih laboratorijih, uporabljene za izvedbo raznolikih procesov, predvsem pa je njihov namen ekstrakcija organskih spojin iz materiala. [1]

V nadaljevanju bo na kratko opisan še princip delovanja oz. kako snov segrejemo s pomočjo mikrovalov. Če segrevamo neko snov po bolj običajnih poteh, kot je npr. z gorilnikom ali vročo ploščo, pride do velikih izgub energije/toplote. Številni dejavniki (toplotna prevodnost materiala, specifična toplota, volumen) vplivajo na segrevanje. Za razliko od tega mikrovalovi omogočajo enakovredno segrevanje (celoten volumen enako segret)(slika 6 (b)), segrevanje in hlajenje sta zelo hitra, izgube energije so majhne (slika 6 (a)). [25]



Slika 6: Primerjava temperaturnih profilov in termalnega obnašanja metode

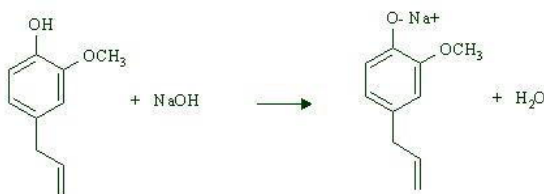
Princip segrevanja s pomočjo mikrovalov je precej zapleten in je osnovan na podlagi neposrednega efekta mikrovalov na molekulo z ionsko kondukcijo, dipolno polarizacijo in dipolno rotacijo, ki povzroči t. i. »supersegrevanje« nekega materiala. Materiale v osnovi delimo v tri skupine glede na to, kako se odzivajo na mikrovalove. Prva skupina odbija mikrovalove (kovine), druga predstavlja tiste materiale, ki so transparentni za mikrovalove (teflon, borovo steklo), tretja pa predstavlja materiale, ki jih absorbirajo (vodne raztopine, polarna topila). Zadnja skupina je najpomembnejša za mikrovalovne sinteze. Če ima neka molekula dipolni moment, ko je izpostavljena mikrovalovom, se poskuša dipol poravnati z dospelim električnim poljem iz mikrovalov. Ker pa električno polje ves čas oscilira oz. niha, poskuša tudi dipol slediti njegovemu gibanju. Pri 2,45 GHz imajo molekule dovolj časa, da se poravnajo z električnim poljem, ne pa dovolj, da bi lahko uspešno sledile gibanju. Neprestana reorientacija molekul pripelje do trenja in segrevanja. Če ima molekula naboj, komponenta električnega polja mikrovalov premika ione po snovi (ionska kondukcija (slika 7)), ti pa se med sabo tudi zaletavajo. To gibanje znova povzroči segrevanje. Ker energija zelo hitro vpliva na molekule, le-te nimajo vmesnega »prostega« časa in generacija toplote je lahko za kratek čas veliko višja kot energija celotne reakcijske zmesi. Tako nastane t. i. »lokalno supersegrevanje«, ki omogoči hitro segrevanje ostale zmesi, obenem pa pride do hitrega ohlajanja, ko ni več dovajanja energije mikrovalov, in te točke supersegrevanja izginejo. Posledično pa tudi temperatura, ki jo lahko pri delu izmerimo, ni temperatura, pri kateri reakcija v resnici poteka. Ozadje delovanja nečesa tako vsakdanjega, kot je mikrovalovna pečica, je torej precej bolj zapleteno, kot se zdi na prvi pogled. [25]



Slika 7: Ionska kondukcija in polarizacija v mikrovalvnem polju

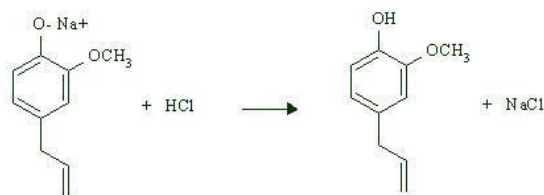
2.5.5 Metoda čiščenja izoliranega produkta

Za nadaljnje prečiščevanje oz. izolacijo evgenola izkoriščamo kislost fenola (od vseh naštetih spojin, ki jih vsebuje eterično olje klinčkov, ima le evgenol fenolno -OH skupino), tako da ga izoliramo s kislinsko-bazno ekstrakcijo. [5] Najprej destilat ekstrahiramo v organsko topilo. Večkratna ekstrakcija z manjšimi količinami topila je učinkovitejša od enkratne ekstrakcije z večjimi količinami, ker ostane v vodni fazi manj topljenca. Z bazo nato spremenimo fenol v ionsko obliko, imenovano fenolat, ki je vodotopen (slika 8).



Slika 8: Reakcija spremembe fenola v ionsko obliko

S tem ga posledično prenesemo v vodno fazo, ostale nefenolne primesi pa bodo ostale v organski fazi. S tem bomo produkt večinoma očistili, ena izmed najpomembnejših komponent, ki se je bomo s tem znebili, je acetilevgenol. S ponovnim nakisanimjem nato evgenol spremenimo nazaj v fenolno obliko, ki je v vodi slabo topna, zato preide nazaj v organsko fazo, kar je prikazano na sliki 9.



Slika 9: Reakcija prehoda evgenola iz ionske v fenolno obliko

Produkt za nadaljnjo uporabo posušimo s sušilnim sredstvom (npr. Na_2SO_4). Produkt prefiltriramo in topilo odparimo, da dokončno očistimo produkt. [13]

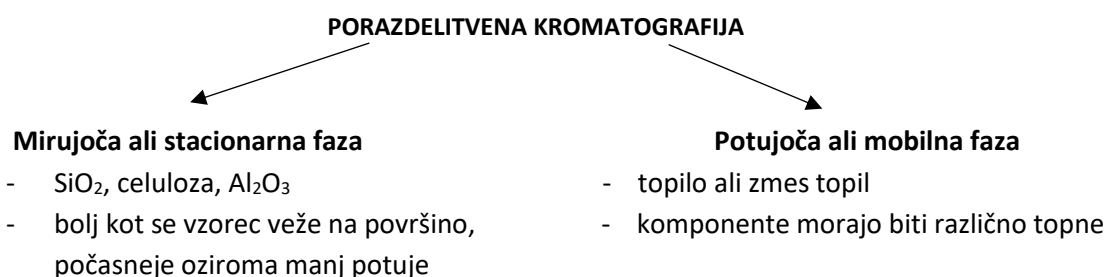
2.5.6 Analizne metode

Po izolaciji želene organske substance na različne načine, želimo produkte analizirati in jih med seboj primerjati ter s tem priti do spoznanja kvalitete in primernosti metod za izolacijo. V nadaljevanju so predstavljene teoretične osnove dveh analiznih metod.

2.5.6.1 Tankoplastna kromatografija

Kromatografija (gr. barvni zapis) je separacijska metoda, ki služi ločevanju komponent v vzorcu ter njihovo kvalitativno in kvantitativno določanje. Poznamo več različnih vrst kromatografije:

- **Ionska kromatografija:** najnovejša vrsta kromatografije, kjer ločba poteka na ionskih izmenjevalcih, na enem izmenjevalcu določamo točno določene ione.
- **Adsorpcijska kromatografija:** ločevanje poteka na osnovi različne jakosti adsorpcije različnih komponent na stacionarno fazo.
- **Porazdelitvena kromatografija:** poteka na osnovi ločevanja zaradi različne adsorpcije na stacionarni fazi in različne topnosti v mobilni fazi. Pod porazdelitveno kromatografijo sodijo papirna, plinska (GC), tekočinska (HPLC) in tankoplastna (PLC) kromatografija.



Ločba komponent je najboljša, če izvajamo delo s topilom oziroma mobilno fazo, v katerem je ena izmed komponent dobro topna, druga pa slabše. Če sta si spojini v nekem vzorcu zelo različni, je ločba toliko lažja, saj ena potuje daleč, druga pa se hitro ustavi. V primeru zelo podobnih komponent je določitev sestave vzorca s kromatografsko metodo zelo otežena. Tako je najpomembnejši in tudi najtežji del kromatografije določiti prave pogoje za delo, torej pravo mobilno fazo.

Tankoplastna kromatografija je kromatografska tehnika, ki se izvaja na plošči iz stekla, plastike ali aluminijeve folije, ki je prekrita s tanko plastjo adsorpcijskega materiala. Ta material je lahko iz silikatnega gela, aluminijevega oksida ali celuloze. Plast adsorpcijskega materiala se imenuje stacionarna faza. Tankoplastno kromatografijo večinoma izvajamo, kadar nas zanima sestava vzorca v bolj kvalitativnem smislu (npr. hitra analiza reakcijske zmesi), uporaba je hitrejša, enostavnejša in cenejša. Prednost te metode predstavlja tudi dejstvo, da lahko z njo analiziramo vzorce, ki vsebujejo nečistoče, ki bi lahko poškodovale drago kromatografsko kolono. [5]

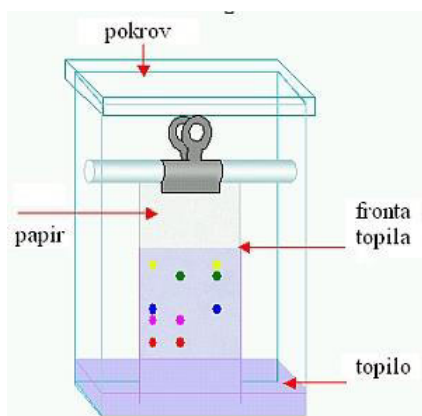
Vzorec nanese na ploščo, ki jo postavimo v kromatografsko komoro z mobilno fazo (zmesjo topil). Topilo potuje od spodaj navzgor in z njim komponente, ki se na svoji poti ločijo na osnovi adsorpcije na stacionarni fazi in topnosti v mobilni fazi.

Pri tankoplastni (tudi HPLC) se pojavlja problem detekcije komponent vzorca. Ta največkrat temelji na absorpciji svetlobe v vidnem ali UV-območju. Če spojine ne absorbirajo svetlobe, jih moramo pretvoriti v derivate, ki jih lahko opazujemo, ali uporabimo drug način detekcije. [5]

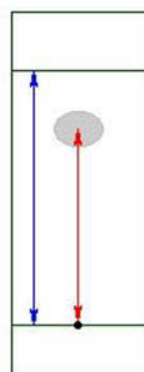
Ko je kromatogram razvit, izmerimo pot topila (fronto topila) in pot komponente v vzorcu, izračunamo retencijske faktorje (R_f) in jih primerjamo z retencijskim faktorjem standardov (slika 11).

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

Enačba 3: Izračun retencijskega faktorja



Slika 10: Kromatografska komora



$$R_f = \frac{\text{pot lise}}{\text{pot topila}}$$

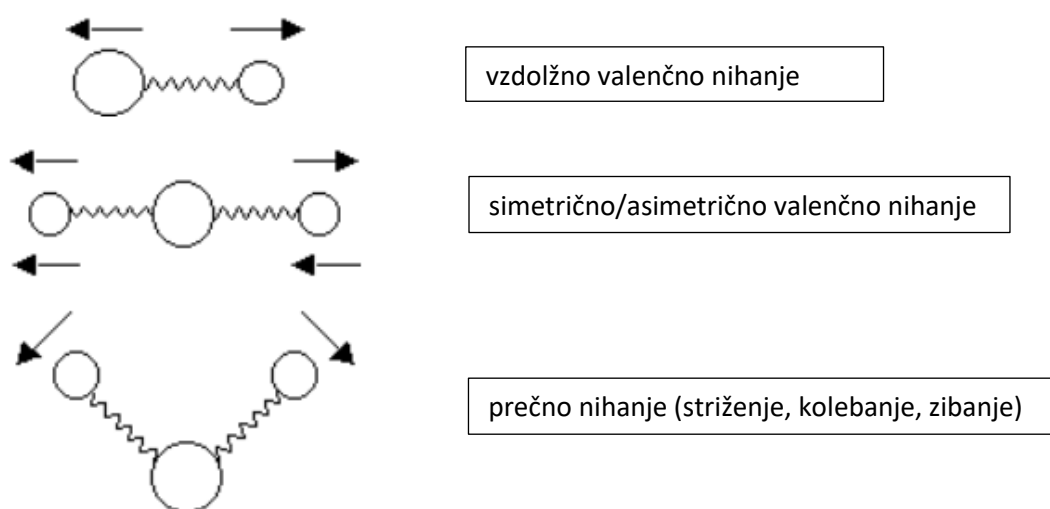
Slika 11: Kromatogram z izračunom R_f

2.5.6.2 Merjenje IR spektra (infrardeča spektroskopija)

Spektroskopija oz. spektralna analiza je analizna metoda, katere bistvo je proučevanje energije sevanja po stiku z neko snovjo. Ena izmed spektroskopskih metod je infrardeča spektroskopija (IR spektroskopija). Pri tej metodi gre za analizo s pomočjo infrardeče svetlobe, ki potuje skozi neko snov. Fotoni infrardečega sevanja z valovnimi dolžinami od 2,5 do 50 μm (te valovne dolžine veljajo le za Mid-IR del) imajo dovolj veliko energijo, da vzbudijo nihanja (rotacije in vibracije) atomov v molekulah. Naprava (infrardeči spektrometer) zaznava in meri to nihanje, ki lahko poteka na različne načine oz. v različne smeri na primer vzdolžno, simetrično, asimetrično, prečno (slika 12). Večja, kot je molekula, več različnih možnosti nihanj obstaja in ravno zaradi tega razloga so IR spektri velikih molekul zelo težavni za analizo.

Infrardečo spektroskopijo delimo glede na območje valovne dolžine, pri kateri spekter merimo. Poznamo bližnjo IR (Near – IR), srednjo IR (Mid – IR) in daljno IR (Far – IR). V namene organske analize, tj. identifikacije spojin, se uporablja srednja infrardeča spektroskopija, ki obsega valovne dolžine od 2,5–25 μm .

Pri tej vrsti IR spektroskopije imajo posamezni tipi vezi oziroma funkcionalnih skupin absorpcijske trakove v točno določenih območjih valovnih dolžin spektra, kar nam omogoča, da lahko iz IR spektra sklepamo na prisotnost ustrezne funkcionalne skupine oziroma strukturnega elementa v molekuli.



vzdolžno valenčno nihanje

simetrično/asimetrično valenčno nihanje

prečno nihanje (striženje, kolebanje, zibanje)

Slika 12: Nihanje atomov v molekuli

V IR spektrih najpogosteje kot nadomestek valovne dolžine uporabljamo valovno število ($\tilde{\nu}$). To število predstavlja recipročno (obratno) vrednost valovne dolžine, enota je cm^{-1} .

Valovno število izračunamo kot:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

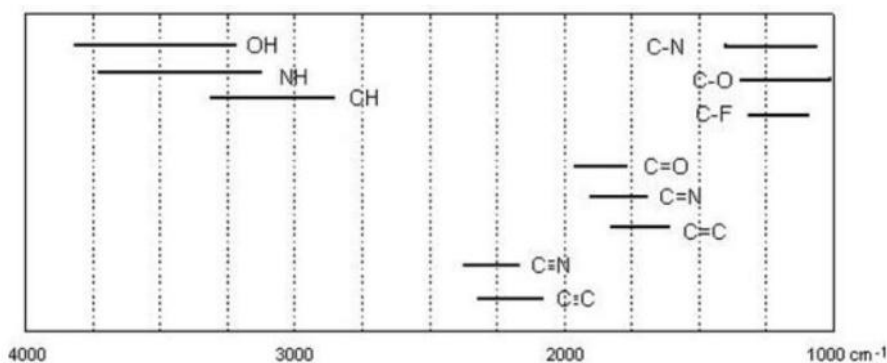
λ - valovna dolžina [nm]

ν - frekvenca valovanja [s^{-1}]

c – hitrost fotona [m/s]

Enačba 4: Izračun valovnega števila

Pri najvišji frekvenci in posledično tudi najvišjem valovnem številu bodo absorbirale tiste skupine, ki imajo lahke atome in med njimi močne vezi. Najlažji element predstavlja vodik, ki je najpogosteje z močnimi vezmi vezan na ogljik, dušik ali kisik. Te močne vezi imajo posledično nato absorpcijske trakove pri visokih valovnih številih. Če pogledamo vezi C-C, C-O, C-N, so med njimi šibkejšje vezi in imajo nižjo frekvenco, dvojne in trojne vezi pa zopet predstavljajo trakove pri višjih valovnih številih, saj so vezi znova močnejše. Na sliki 13 so prikazana območja absorpcijskih trakov posameznih tipov vezi.



Slika 13: Območja absorpcijskih trakov posameznih tipov vezi

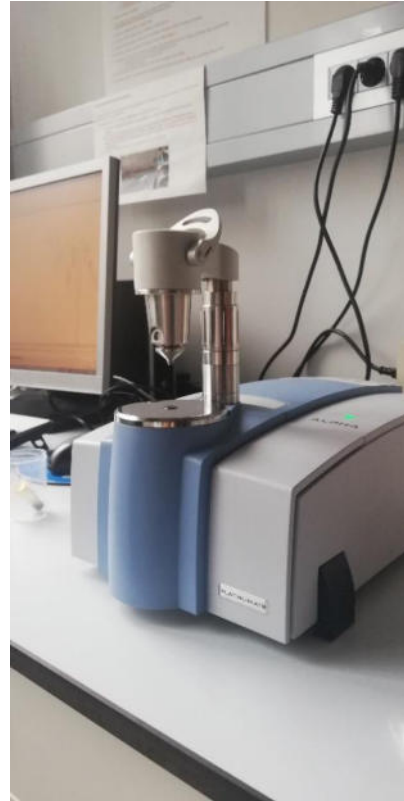
V spektru ugotavljamo prisotnost funkcionalnih skupin v območju $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (Mid-IR), kar je med tema vrednostma velja za območje za identifikacijo spojin, ki ga imenujemo tudi območje prstnega odtisa. Samo identični spojin ob zagotovljenih popolnoma enakih pogojih, lahko imata enak spekter. Omenjeno je bilo dejstvo, da imajo posamezni tipi vezi in funkcionalnih skupin absorpcijske trakove pri določenih valovnih številih, kar nam omogoča določitev le-teh v neki snovi oz. njihovo identifikacijo. V ta namen so pripravljene tabele z absorpcijskimi vrhovi različnih skupin in vezi, kar nam omogoči njihovo identifikacijo (priloga 2). [20]

Na ponovljivost meritev spektrov pa vpliva tudi uporabljen instrument, predvsem v kakšnem načinu je bil vzorec merjen. Kako vzorec merimo, je odvisno od agregatnega stanja le-tega. Plinaste vzorce in hlapne tekočine lahko merimo v posebnih plinskih celicah, raztopine in tekočine v posebnih kivetah, ki ne absorbirajo IR sevanja (steklo absorbira) in jih naš vzorec ne raztaplja (NaCl kivete za nevodne raztopine), trdne snovi se pa lahko merijo stisnjene v KBr disk in raztopljene v parafinskem olju (Nujol olje). Trdne snovi in tekočine pa lahko merimo tudi na ATR (attenuated total reflectance) nastavku, kjer na kristal postavimo vzorec, če je trden, ga stisnemo, in merimo na podlagi popolnega odboja IR svetlobe.

Infrardeča spektrometrija spada med zanesljive tehnike, ki se pogosto uporablja v industriji in raziskavah. Ta metoda ima številne prednosti, kot je na primer zelo majhna potrebna količina vzorca za izvedbo analize, večina molekul ima vibracijske prehode, posledično je lahko vzorec v katerem koli agregatnem stanju, prav tako pa so meritve izvedene zelo hitro. Lahko pa pride do težave pri identifikaciji mešanic ali velikih molekul, saj se absorpcijski trakovi prekrivajo in je delo precej oteženo. Primer uporabe IR spektrometrije je analiza polimerov, s katero določajo sestavo le-teh, v vsakdanjem življenju pa je pogosta uporaba teh meritve v prehrabeni industriji. Tam metodo uporabljajo za določanje koncentracij sestavin. [20, 21] Na sliki 14 in 15 je prikazan IR spektrometer.



Slika 15: IR spektrometer



Slika 14: IR spektrometer

3 EKSPERIMENTALNI DEL

V eksperimentalnem delu so opisane metode izolacije evgenola, čiščenje in analiza produkta.

3.1 Destilacija z vodno paro

Za izolacijo evgenola z destilacijo z vodno paro in njegovo čiščenje potrebujemo inventar in kemikalije navedene v tabeli 3, 4 in 5.

3.1.1 Inventar

Tabela 3: Inventar za parno destilacijo



destilacijska bučka, 500 mL	laboratorijsko stojalo, 4x	račvasta prižema	okrogla prižema	mufa, 3x
filtrirni obroč	žlička	parorazvijalec	cev za izenačevanje pritiska	aluminijasta folija
parafilm	precizna tehtnica, KERN PFB, d = 0,01 g	Liebigov hladilnik	stišek	lij ločnik, 500 mL
nastavek za parno destilacijo	nastavek za vodni hladilnik	nastavek za destilacijsko bučko	trinožno stojalo	keramična mrežica
gorilnik	čaša, 250 mL	mlinček za kavo		

Tabela 4: Inventar za kislinsko-bazno ekstrakcijo

lij ločnik, 250 mL, 3x	laboratorijsko stojalo	digestorij	merilni valj, 25 mL, 2x	merilni valj, 10 mL
filtrirni obroč	jodirka z zamaškom	lij	naguban filtrirni papir	žlička
bučka rotavaporja, 50 mL	rotavapor	analizna tehtnica, Adventurer Pro, OHAUS		

3.1.2 Kemikalije

Tabela 5: Kemikalije za izolacijo s parno destilacijo

Formula in ime	Dodatne informacije	Znaki za nevarnost	Količina
klinčki	celi, MAESTRO, Podravka, 30 g	/	10,03 g
CH₂Cl₂ , diklorometan	p.a. ACS reagent, SIGMA-ALDRICH		60,0 mL
NaOH , natrijev hidroksid	ω = 5 %	/	10,0 mL
HCl , klorovodikova kislina	c = 1 M		10,0 mL
Na₂SO₄ , natrijev sulfat(VI)	pro analysi, MERCK	/	5,0 g

Pri delu uporabljamo dražljive, zdravju nevarne kemikalije, zato oblačila in kožo zaščitimo z zaščitno haljo. Uporabljamo zaščitne rokavice. Odzračevanje lijev pri kislinsko–bazni ekstrakciji opravljamo v digestoriju.

3.1.3 Postopek

Pred delom si pripravimo vzorec. Cele klinčke zmeljemo, da dobimo čim večjo površino. Sestavimo napravo za destilacijo z vodno paro (slika 16). V destilacijsko bučko na precizni tehtnici zatehtamo 10,0 g zmletih klinčkov. Dolijemo vročo destilirano vodo do približno 1/3 volumna bučke. Ko začne iz parorazvijalca izhajati para, povežemo celotno aparaturo, da začne para potovati naprej in se začne sama destilacija, in odpremo dotok hladilne vode. Pustimo destilirati, dokler destilacija ne poteka več ali dokler ne zberemo približno 150–200 mL produkta. Celoten postopek traja približno 4 ure. Končen produkt je bela suspenzija, v kateri vidimo kapljice eteričnega olja.



Slika 16: Destilacija z vodno paro

IZOLACIJA EVGENOLA: V nadaljevanju produkt ekstrahiramo v organsko topilo. Destilatu v liju ločniku dolijemo 15 mL CH_2Cl_2 , lij večkrat pretresemo in pazimo na odzračevanje. Odzračujemo v digestoriju. Postavimo na filtrirni obroč, da se vodna in organska faza ločita (slika 17). Spodnjo, organsko fazo odlijemo v drug lij ločnik (slika 18), vodni fazi pa dodamo še 15 ml CH_2Cl_2 in postopek ponovimo. Na združenih organskih fazah izvedemo kislinsko bazno ekstrakcijo, s katero ločimo evgenol od acetil evgenola. Raztopino stresamo s 5 mL predhodno pripravljeno 5 % raztopine NaOH (slika 19). Spodnjo organsko plast odlijemo spodaj, vodno fazo pa skozi ustje lija v pripravljen naslednji lij ločnik. Z organsko fazo ponovimo postopek stresanja, v vodni fazi pa je sedaj evgenol v obliki soli. Združimo obe pridobljeni vodni fazi in dodamo 10 mL 1M HCl, da preide evgenol nazaj v fenolno obliko (slika 21), ki je v vodi slabo topna. Ponovimo ekstrakcijo z diklorometanom v dveh serijah (slika 22). Združeni organski fazi prenesemo v čisto jodirko. Dodamo dve žlički sušilnega sredstva Na_2SO_4 . Pustimo stati v temnem prostoru. Raztopino prefiltriramo skozi naguban filtrirni papir v suho stehatno bučko rotavaporja. Uparimo organsko topilo pri približno 40 °C. Počakamo, da se ohladi, in stehatmo bučko z izoliranim produktom.



Slika 17: Ekstrakcija v organsko topilo



Slika 18: Organska faza



Slika 21: Stresanje z NaOH



Slika 19: Fenolat (lij ločnik št. 3, desno)



Slika 22: Nakisanje



Slika 20: Ekstrakcija s CH_2Cl_2

3.1.4 Meritve in račun

m (klinčkov)= 10,03 g

m (bučka)= 45,3140 g

m (bučka+produkt)= 46,4089 g

m (produkta) = m (bučka + produkt) – m(bučke) = 46,4089 g – 45,3140 g = **1,0949 g**

MASA EVGENOLA

IZKORISTEK PROCESA:

$$\eta = \frac{m(\text{evgenola})}{m(\text{klinčkov})} \quad \text{Enačba 5: Izračun izkoristka}$$

$$\eta = \frac{1,0949 \text{ g}}{10,0300 \text{ g}}$$

$$\eta = 0,1092 \quad \mathbf{10,92 \%}$$

3.2 Navadna destilacija

Za izolacijo evgenola z navadno destilacijo potrebujemo inventar, ki je naveden v tabeli 6, in kemikalije iz tabele 7.

3.2.1 Inventar

Tabela 6: Inventar za navadno destilacijo



destilacijska bučka, 500 mL	nastavek za destilacijsko bučko	temometer, - 20 °–150 °C	Liebigov hladilnik	nastavek za laboratorijski hladilnik
lij ločnik, 500 mL	laboratorijsko stojalo, 3x	okrogla prižema	račvasta prižema	mufa, 2x
filtrirni obroč	destilacijska bučka, 100 mL	trinožno stojalo	vrelne kroglice	keramična mrežica
gorilnik	precizna tehtnica, KERN PFB, d =0,01g	žlička	parafilm	mlinček za kavo

Inventar in kemikalije za kislinsko-bazno ekstrakcijo so enake kot pri postopku parne destilacije (str. 24).

3.2.2 Kemikalije

Pri delu uporabljamo dražljive, zdravju nevarne kemikalije, zato oblačila in kožo zaščitimo z zaščitno haljo. Uporabljamo zaščitne rokavice. Odzračevanje pri kislinsko-bazni ekstrakciji opravljamo v digestoriju. Kemikalije so predstavljene v nadaljevanju.

Tabela 7: Kemikalije za izolacijo z navadno destilacijo

Formula in ime	Dodatne informacije	Znaki za nevarnost	Količina
klinčki	celi, MAESTRO, Podravka, 30 g	/	10,0 g
CH₂Cl₂ , diklorometan	p.a. ACS reagent, SIGMA-ALDRICH		60,0 mL
NaOH , natrijev hidroksid	$\omega = 5 \%$	/	10,0 mL
HCl , klorovodikova kislina	$c = 1 \text{ M}$		10,0 mL
Na₂SO₄ , natrijev sulfat(VI)	pro analysi, MERCK	/	5,0 g
H₂O , destilirana voda	/	/	300 mL

3.2.3 Postopek

Pred delom si pripravimo vzorec. Cele klinčke zmeljemo, da dobimo čim večjo površino. Sestavimo napravo za navadno destilacijo (slika 23). V bučko z vrelnimi kamenčki zatehtamo 10,00 g klinčkov in dolijemo vročo destilirano vodo do maksimalno 2/3 bučke. Segrevamo in kondenzat lovimo v vpet lij ločnik. Destilacija poteka najmanj 6 ur.

V nadaljevanju produkt ekstrahiramo v organsko topilo in izvedemo kislinsko-bazno ekstrakcijo. Postopek je enak kot pri obdelavi produkta po parni destilaciji (str. 25).



Slika 23: Navadna destilacija

3.2.4 Meritve in račun

$m(\text{klinčkov}) = 10,00 \text{ g}$

$m(\text{bučka}) = 80,31 \text{ g}$

$m(\text{bučka+produkt}) = 82,62 \text{ g}$

$m(\text{produkta}) = m(\text{bučka + produkt}) - m(\text{bučke}) = 82,62 \text{ g} - 80,31 \text{ g} = \mathbf{2,31 \text{ g}}$

MASA EVGENOLA

IZKORISTEK PROCESA:

$$\eta = \frac{m(\text{evgenola})}{m(\text{klinčkov})}$$

$$\eta = \frac{2,31 \text{ g}}{10,00 \text{ g}}$$

$$\eta = 0,2310 \quad \mathbf{23,10 \%}$$

3.3 Ekstrakcija trdo-tekoče (Soxhlet)

Za to ekstrakcijo potrebujemo inventar in kemikalije, predstavljene v tabeli 8 in 9.


3.3.1 Inventar

Tabela 8: Inventar za ekstrakcijo trdno-tekoče po Soxhletu

Soxhletov aparat (ekstrahirka, ekstraktor, vodni hladilnik)	grelna plošča	čša, 600 mL	destilacijska bučka, 250 mL	laboratorijsko stojalo
mufa, 3x	račvasta prižema, 2x	okrogla prižema	žlička	precizna tehtnica, KERN PFB, d = 0,01 g
digestorij	čša, 50 mL	analizna tehnica, Adventurer Pro, OHAUS	vata	tulec iz filtrirnega papirja
rotavapor	mlinček za kavo			

3.3.2 Kemikalije

Tabela 9: Kemikalije za ekstrakcijo po Soxhletu

Formula in ime	Dodatne informacije	Znaki za nevarnost	Količina
klinčki	celi, MAESTRO, Podravka, 30 g	/	26,05 g
CH₃OH , metanol	p.a., ACS Reagent, HONEYWELL		150 mL

Pri delu uporabljamo dražljive, zdravju nevarne kemikalije, zato oblačila in kožo zaščitimo z zaščitno haljo. Uporabljamo zaščitne rokavice. S kemikalijami se ne približujemo virom toplote.

3.3.3 Postopek

Zmlete klinčke zatehtamo v tulec iz filtrirnega papirja. Pokrijemo z vato in namestimo v nastavek (ekstraktor). V nastavek nalijemo topilo in do konca sestavimo aparaturu tako, da namestimo hladilnik in ga povežemo z dotokom vode. Na dno naprave namestimo stehtano bučko v vodni kopeli. Začnemo segrevati in pustimo, da poteka ekstrakcija. Postopek je dolgotrajen, število obtokov je majhno. Tik preden pride do zadnjega obtoka, ekstrakcijo ustavimo, saj se s tem izognemo dodatnemu uparovanju topila z rotavaporjem. Končni produkt je nečist, temno obarvan in visoke gostote. Glede na rezultate po izvedenih končnih analizah produkta bi bilo potrebno dodatno čiščenje izolirane snovi. Na sliki 24 je prikazan Soxhletov aparat.



Slika 24: Ekstrakcija po Soxhletu

3.3.4 Meritve in račun

$m(\text{klinčkov}) = 26,05 \text{ g}$

$m(\text{bučka}) = 133,50 \text{ g}$

$m(\text{bučka} + \text{produkt}) = 146,82 \text{ g}$

$m(\text{produkta}) = m(\text{bučka} + \text{produkt}) - m(\text{bučke}) = 146,82 \text{ g} - 133,50 \text{ g} = \mathbf{13,32 \text{ g}}$

MASA EVGENOLA

IZKORISTEK PROCESA:

$$\eta = \frac{m(\text{evgenola})}{m(\text{klinčkov})}$$

$$\eta = \frac{13,32 \text{ g}}{26,05 \text{ g}}$$

$$\eta = \mathbf{0,511} \quad \mathbf{51,1 \%}$$

3.4 Maceracija z metanolom

Pri podvrsti ekstrakcije trdno-tekoče, imenovani maceracija, je za delo potreben inventar, prikazan v tabeli 10, in kemikalije iz tabele 11.


3.4.1 Inventar

Tabela 10: Inventar za ekstrakcijo trdno-tekoče z maceracijo

erlenmajerica, 300 mL	precizna tehtnica, KERN PFB, d = 0,01g	merilni valj, 100 mL	stresalnik, KS250 basic, IKALABORTECHNIK	Parafilm
filtrirni papir	lij	laboratorijsko stojalo	filtrirni obroč	bučka rotavaporja, 250 mL
rotavapor	analizna tehtnica, Adventurer Pro, OHAUS	mlinček za kavo		

3.4.2 Kemikalije

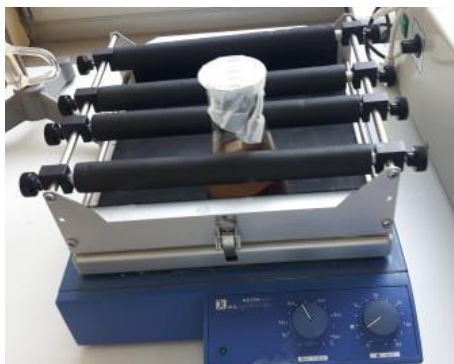
Tabela 11: Kemikalije za maceracijo

Formula in ime	Dodatne informacije	Znaki za nevarnost	Količina
Klinčki	celi, MAESTRO, Podravka, 30 g	/	50,0 g
CH₃OH , metanol	p.a., ACS Reagent, HONEYWELL		150 mL

Pri delu uporabljamo dražljive, zdravju nevarne kemikalije, zato oblačila in kožo zaščitimo z zaščitno haljo. Uporabljamo zaščitne rokavice. S kemikalijami se ne približujemo virom toplote.

3.4.3 Postopek

V erlenmajerici zatehtamo 50 g zdrobljenih klinčkov. Dolijemo metanol in na stresalniku stresamo 6 ur (slika 25). Produkt pustimo stati nadaljnjih 18 ur (slika 26). Dvakrat prefiltriramo preko nagubanega filtrirnega papirja v stehtano bučko rotavaporja (slika 27). Na rotavaporju uparimo organsko topilo (slika 28), počakamo, da se ohladi, in stehtamo bučko z izoliranim produktom. Končni produkt je nečist, temno obarvan in visoke gostote. Glede na rezultate po izvedenih končnih analizah produkta bi bilo potrebno dodatno čiščenje snovi.



Slika 25: Stresanje vzorca

Slika 26: Produkt po stresanju

Slika 27: Filtracija

Slika 28: Odparevanje topila

3.4.4 Meritve in račun

$$m(\text{klinčkov}) = 50,00 \text{ g}$$

$$m(\text{bučka}) = 124,48 \text{ g}$$

$$m(\text{bučka} + \text{produkt}) = 152,57 \text{ g}$$

$$m(\text{produkta}) = m(\text{bučka} + \text{produkt}) - m(\text{bučke}) = 152,57 \text{ g} - 124,48 \text{ g} = \mathbf{28,09 \text{ g}}$$

MASA EVGENOLA

IZKORISTEK PROCESA:

$$\eta = \frac{m(\text{evgenola})}{m(\text{klinčkov})}$$

$$\eta = \frac{28,09 \text{ g}}{50,00 \text{ g}}$$

$$\eta = \mathbf{0,562} \quad \mathbf{56,2 \%}$$

3.5 Izolacija z mikrovalovi

Za postopek izolacije z mikrovalovi je potreben inventar iz tabele 12 in kemikalije iz tabele 13.


3.5.1 Inventar

Tabela 12: Inventar za izolacijo z mikrovalovi

mikrovalovna pečica	posodica, primerna za mikrovalovko	erlenmajerica, 250 mL, ozek vrat	termometer, -20 °–150 °C	precizna tehtnica, KERN PFB, d = 0,01g
žlička	Prijemalka	injekcija, 25 mL	CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, syringe filter	epruveta
kapalka	stojalo za epruvete			

3.5.2 Kemikalije

Tabela 13: Kemikalije za izolacijo z mikrovalovi

Formula in ime	Dodatne informacije	Znaki za nevarnost	Količina
klinčki	celi, MAESTRO, Podravka, 30 g	/	3,00 g
C₂H₅OH , etanol	96 %, Ph.Eur., PHARMACHEM		130 mL
H₂O , destilirana voda	/	/	120 mL

3.5.3 Postopek

Pred delom preučimo različne možnosti izolacije z mikrovalovi. Potrebno je delo s poskušanjem, da določimo pravilne parametre za izolacijo. Zatehtamo določeno maso zmletih klinčkov. Nasujemo jih v erlenmajerico z ozkim vratom. Čez nalijemo destilirano vodo in etanol v razmerju 12 : 8. Mikrovalovno pečico nastavimo na najnižjo do srednje stopnjo moči delovanja in jo zaprto grejemo v mikrovalovki 3 minute. Po treh minutah izmerimo temperaturo, ki zanaša med 72 in 80 °C. Erlenmajerico odkrijemo in ponovno segrevamo. Postopek ponovimo štirikrat, nato vzorcu dodamo 50 mL etanola. Ponovimo še trikrat. Vzorce odvajamo iz različnih stopenj postopka (po 12 minutah, pred dodatkom etanola, po 18 minutah itd.) (slika 30) in jih z injkcijami prefiltriramo s syringe filtri (slika 29). V injkciji izvedemo kislinsko-bazno ekstrakcijo po enakem postopku kot pri parni destilaciji (str. 23), le da pri delu uporabimo manjše količine. Odvisno od količine vzorca, s katerim opravljamo delo, se po potrebi poslužujemo rotavaporja za odparevanje topila.



Slika 29: Filtracija s syringa filtri



Slika 30: Vzorci različnih stopenj postopka

3.6 Analizni postopki

Po izolaciji produkta na različne načine je bila potrebna identifikacija pridobljene snovi. Kot analiza postopka izvajamo tankoplastno kromatografijo in IR spektroskopijo.

3.6.1 Tankoplastna kromatografija

Identifikacijski postopek tankoplastne kromatografije izvajamo z inventarjem, ki ga najdemo v tabeli 14, in kemikalijami iz tabele 15.

3.6.1.1 Inventar

Tabela 14: Inventar za tankoplastno kromatografijo

komora s pokrovom za tankoplastno kromatografijo	merilni valj, 10 mL	merilni valj, 100 mL	plošča za tankoplastno kromatografijo	kapilare
digestorij	UV komora			

3.6.1.2 Kemikalije

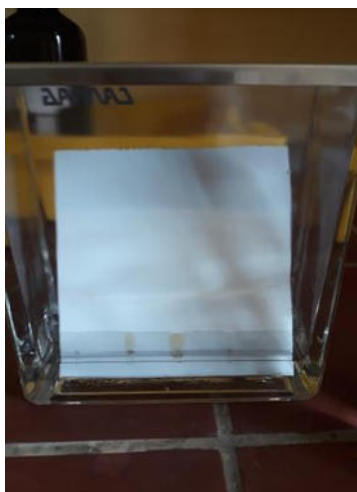
Tabela 15: Kemikalije za identifikacijo produktov

Formula in ime	Dodatne informacije	Znaki za nevarnost	Količina
C₁₀H₁₂O₂ , evgenol	99 %, SIGMA-ALDRICH		1,0 mL
CH₃OH , metanol	p.a., ACS Reagent, HONEYWELL		95,0 mL
CHCl₃ , kloroform	p.a., reag., SIGMA-ALDRICH		5,0 mL

Pri delu uporabljamo dražljive, zdravju nevarne kemikalije, zato oblačila in kožo zaščitimo z zaščitno haljo. Uporabljamo zaščitne rokavice. Mobilno fazo pripravljamo v digestoriju. Prav tako, zaradi nevarnih hlapnih kemikalij, pustimo, da celoten proces poteka pri primernem odzračevanju – v digestoriju.

3.6.1.3 Postopek

Pripravimo mobilno fazo (95 % metanola + 5 % kloroforma), jo prenesemo v komoro in pustimo najmanj 30 minut, da se nasiti s hlapi. Medtem si pripravimo ploščo. Narišemo startno črto, označimo vzorce in jih s kapilaro naneseemo. Ploščo namestimo v komoro in pustimo, da mobilna faza prepotuje ploščo približno 1 cm do zgornjega roba (slika 31). Narišemo črto, do koder je pripotovala mobilna faza, in ploščo posušimo. Pod UV svetlobo (366 nm) lahko vidimo in primerjamo produkte med sabo in glede na 99 % čist evgenol.



Slika 31: Razvijanje kromatograma

3.6.1.4 Meritve in račun

V tabeli 16 in 17 so predstavljene meritve in retencijski faktorji vzorcev po kromatografiji.

$$R_f = \frac{d_i}{d} \quad \text{Enačba 6: Izračun retencijskega faktorja}$$

Tabela 16: Retencijski faktorji vzorcev

vzorec oz. metoda	d_i [cm]	d [cm]	R_f
standard evgenola	12,0	17,5	0,69
parna destilacija	12,4	17,5	0,71
navadna destilacija	13,0	17,5	0,74
maceracija	12,5	17,5	0,72
ekstrakcija po Soxhletu	13,0	17,5	0,74

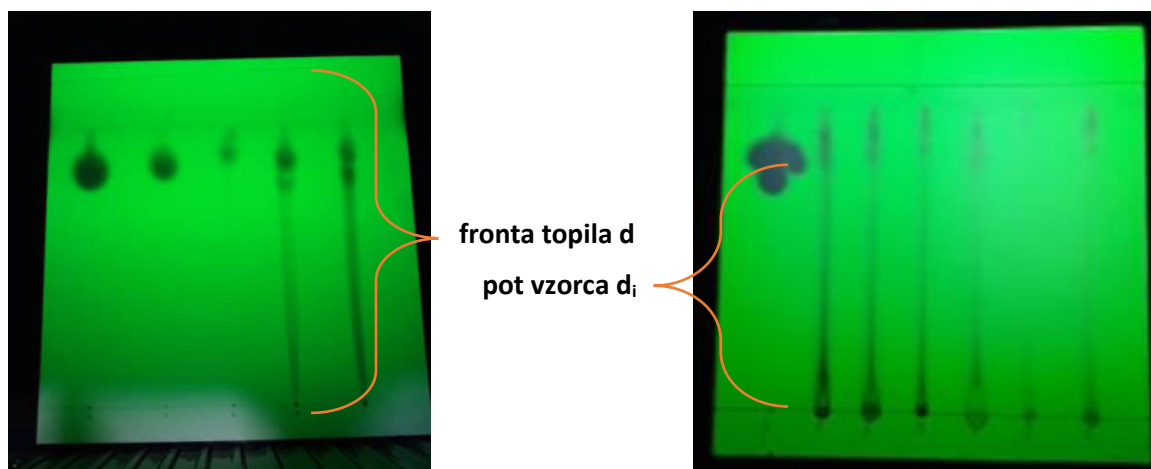
Vrstni red vzorcev na sliki 32 (kromatogramu) je enak vrstnemu redu vzorcev oz. metod v tabeli 16.

Tabela 17: Retencijski faktor izolacije z mikrovalovi

vzorec oz. metoda	d_i [cm]	d [cm]	R_f
standard evgenola	10,5	13,0	0,81
mikrovalovi	11,1	13,0	0,85

Na sliki 32 je predstavljen kromatogram čistega evgenola in produktov pridobljenih z metodami parne destilacije, navadne destilacije, maceracije in ekstrakcije po Soxhletu. Na sliki 33 je kromatogram

čistega evgenola in produktov pridobljenih iz različnih stopenj procesa izolacije z mikrovalovi. Oba kromatograma je potrebno za detekcijo komponent opazovati pod UV svetlobo.



Slika 32: Kromatogram vzorcev pod UV svetlobo

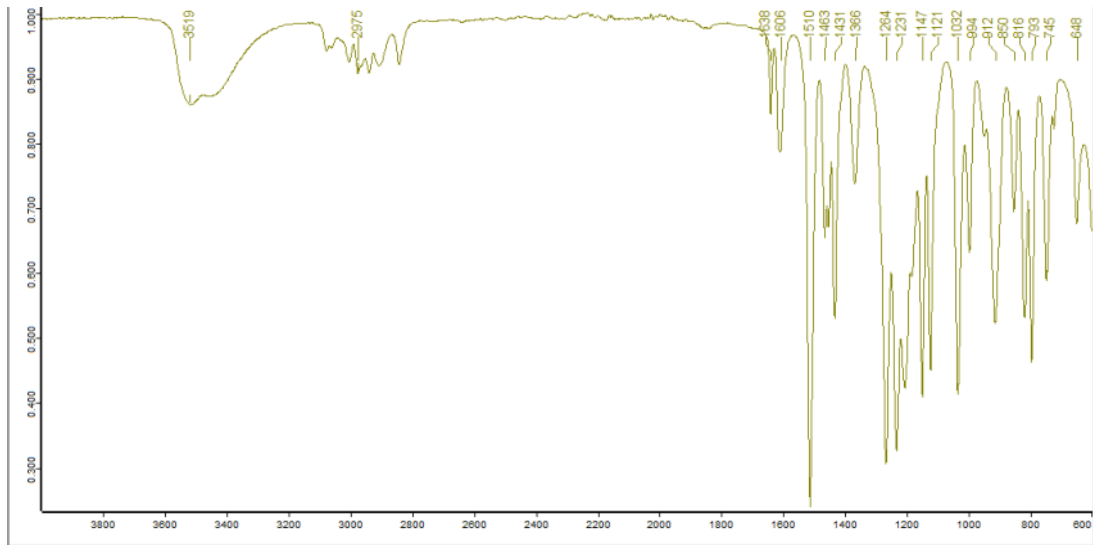
Slika 33: Kromatogram vzorcev izolacije z mikrovalovi

3.6.2 IR spektroskopija

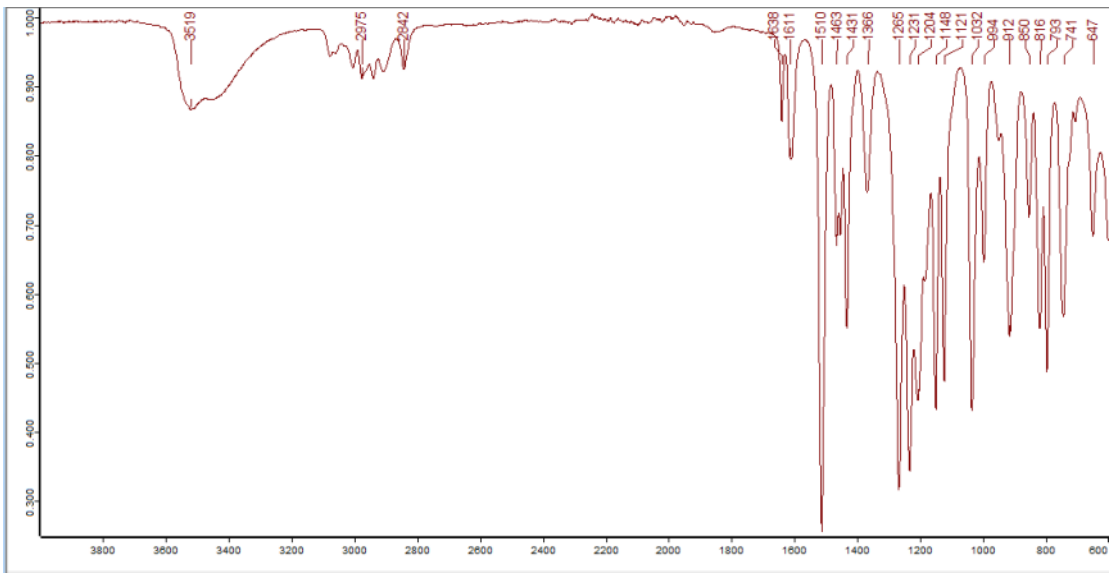
IR spektroskopija kot identifikacijska metoda je bila izvedena na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Potrebna je bila le priprava in očiščenje vzorcev. Spektri so bili posneti na Bruker FTIR Alpha Platinum ATR spektrometru (slika 34). Po meritvi sem prejela grafe, prikazane na str. 36 in 37, potrebna je bila le še njihova analiza.



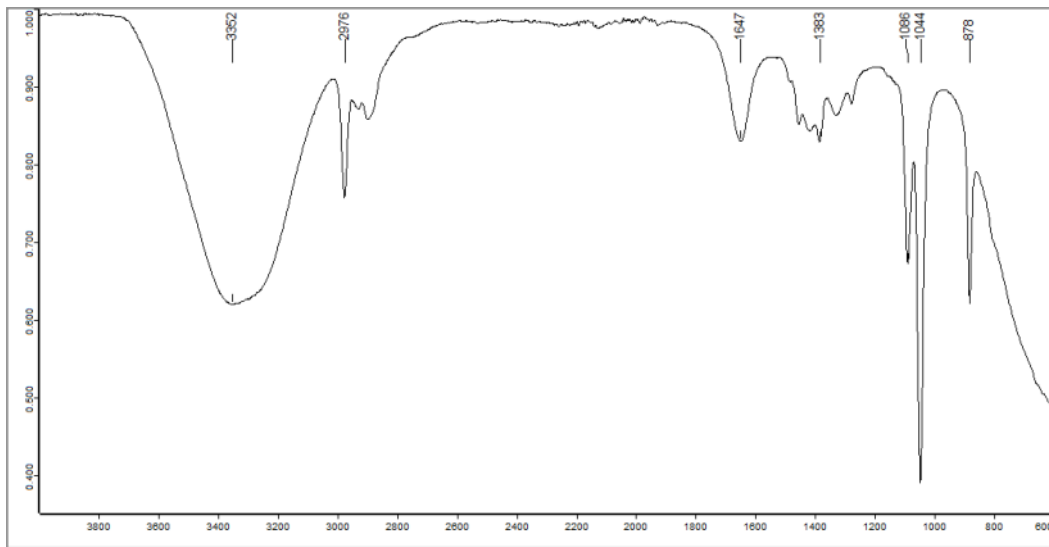
Slika 34: Bruker FTIR Alpha Platinum spektrometer



Graf 1: IR spekter evgenola (standard)



Graf 2: IR spekter evgenola (parna destilacija)



Graf 3: IR spekter evgenola (mikrovalovi; vzorec 2)

4 REZULTATI IN KOMENTAR

IZKORISTKI METOD

Tabela 18: Izkoristki metod

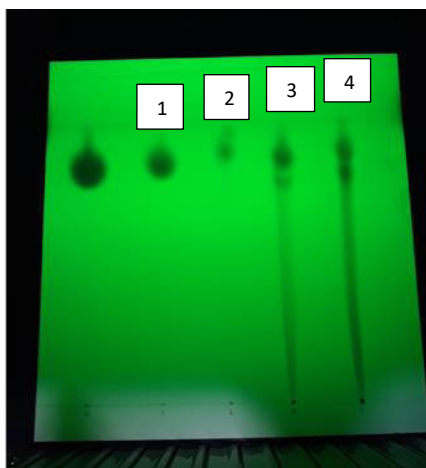
Evgenol, izoliran:	s parno destilacijo	z navadno destilacijo	z ekstrakcijo po soxhletu	z maceracijo	z mikrovalovi
izkoristek postopka	10,92 %	23,1 %	51,1 %	56,2 %	/

Če primerjamo izkoristke metod, zaznamo precej velike razlike. Vsem postopkom je sicer skupen precej velik izkoristek, kar običajno ni tako, saj izkoristki pri ekstrakcijah organskih spojin iz biološkega materiala vsaj po navadi niso tako visoki (seveda je vse odvisno od snovi, iz katere želimo pridobiti neko spojino). Razberemo lahko, da je bil izkoristek najmanjši pri parni destilaciji, toda dejstvo, ki ga lahko dokažemo tudi z IR spektri je, da je ta produkt daleč najbolj čist in skoraj popolnoma enak 99 % čistemu evgenolu. Pri navadni destilaciji je poleg evgenola v produktu prisotnih tudi nekaj več drugih snovi, pri ostalih dveh metodah pa po končani ekstrakciji ni bila izvedena kislinsko-bazna ekstrakcija za dodatno čiščenje, kar razloži tako visok izkoristek. V teh dveh vzorcih je namreč poleg evgenola prisoten tudi acetil evgenol in ostale snovi, običajno prisotne v ekstraktih nageljnovih žbic. Pri izolaciji z mikrovalovi pa zaradi izjemno majhnih količin, ki jih je bilo težko že očistiti, in precej velikega števila že predhodno neuspešnih poskusov izolacije, nisem računala izkoristka postopka.

RETENCIJSKI FAKTORJI

Evgenol, izoliran:	s parno destilacijo	z navadno destilacijo	z ekstrakcijo po Soxhletu	z maceracijo	z mikrovalovi	99 % EVGENOL
Retencijski faktor	0,71	0,74	0,74	0,72	/	0,69
					0,85	0,81

Za identifikacijo spojine sem izvedla tankoplastno kromatografijo, iz katere sem kot rezultat pridobila kromatogram, iz katerega sem izračunala retencijske faktorje. Če imata dve snovi enak ali zelo podoben kromatogram, nam to pokaže, da imata snovi enako sestavo, oziroma v mojem primeru, vsebujeta evgenol. Za prve štiri postopke izolacije sem izvedla le eno tankoplastno kromatografijo, saj sem lahko takoj določila, da je v vseh vzorcih prisoten evgenol, kar lahko razberemo tudi iz retencijskih faktorjev. Pri izolaciji z mikrovalovi je bilo potrebnih precej več poskusov, zato je bilo dodatno izvedenih še šest kromatografij, saj mi pri postopku ni uspelo pridobiti zelenega produkta. V teh primerih je vzorec izhlapel, ostal na startni liniji ali pa je s topilom prepotoval veliko manjšo razdaljo kot evgenol. V tabeli lahko zato pri standardu evgenola na koncu vidimo dva različna retencijska faktorja. Prvi je tisti, ki sem ga izračunala iz prvega kromatograma, kjer so bili nanešeni vzorci, pridobljeni po prvih štirih metodah. Drugi predstavlja tistega, ki sem ga lahko izračunala po prvem uspelem poskusu, ko je produkt izolacije z mikrovalovi skupaj s topilom prepotoval precej podobno razdaljo kot standard.



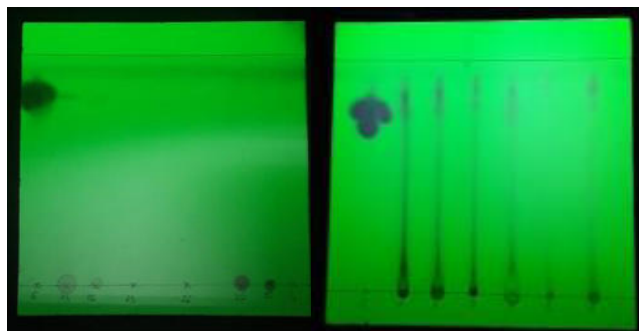
LEGENDA:

- 1 – parna destilacija**
- 2 – navadna destilacija**
- 3 – ekstrakcija po Soxhletu**
- 4 – maceracija**

Slika 35: Kromatogram vzorcev prvih štirih metod in standarda

Če si pogledamo kromatogram (slika 35), vidimo, da standard (prva lisa z leve) predstavlja najtemnejšo in najlepše oblikovano liso, ki jo nato primerjamo z ostalimi vzorci.

Produkt parne destilacije ima retencijski faktor najbolj podoben čistemu produktu, lisa je lepo oblikovana in precej temno obarvana. To nam pokaže, da smo uspeli izolirati čist, kvaliteten produkt. Pri navadni destilaciji je produkta manj, lisa je svetla, retencijski faktor je malce višji. Pri produktih maceracije in ekstrakcije po Soxhletu pa smo sicer dobili želeni produkt, kar lahko razberemo iz tega, da so lise tam lepše in bolj izoblikovane ter temnejše (na težišču odebelitve te lise izmerimo tudi pot lise in posledično gledano izračunamo retencijski faktor), vendar je prisotnih tudi veliko nam neželenih snovi. To nam pokaže dejstvo, da so lise raztegnjene in neizoblikovane. Te snovi so prisotne, ker po ekstrakciji ni bil izveden nikakršen postopek čiščenja, razen filtracije. Pri obeh destilacijah je bila izvedena kislinsko-bazna ekstrakcija. Evgenol je prisoten v teh dveh vzorcih in skupaj s topilom prepotuje pričakovano razdaljo, a druge snovi prav tako potujejo skupaj s topilom, nekatere so v njem bolje topne, zato potujejo dlje od evgenola, večinoma pa slabše, zato izoblikujejo sled pod liso evgenola. Če med sabo primerjamo sledi vzorca 3 in 4, vidimo, da sta si sicer lisi podobni, a produkt pridobljen po Soxhletu, je čistejši (lisa pod evgenolom je bolj bleda), količina evgenola pa je večja (temnejša osrednja lisa) kot pri produktu maceracije.



Slika 36: Kromatogram neuspele in uspele izolacije z mikrovalovi

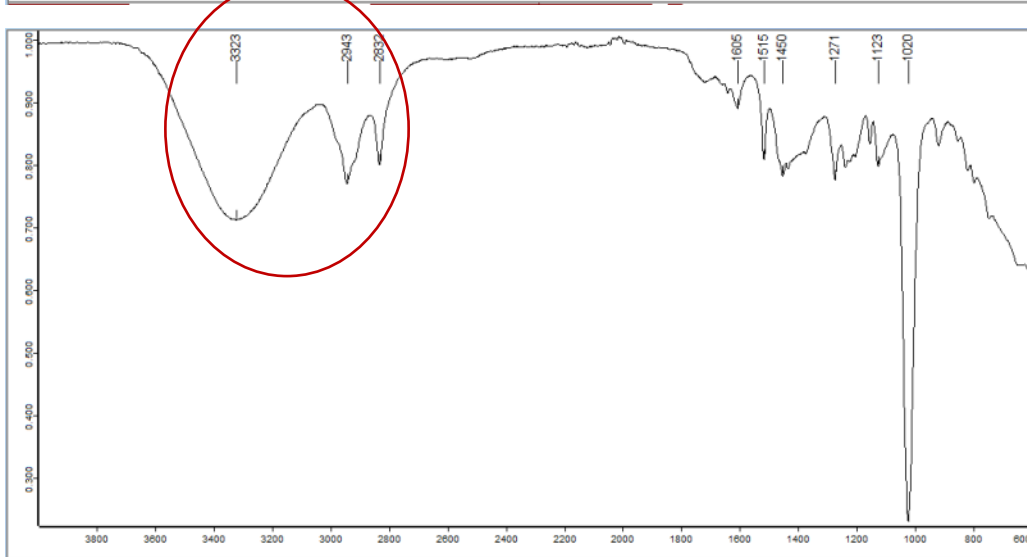
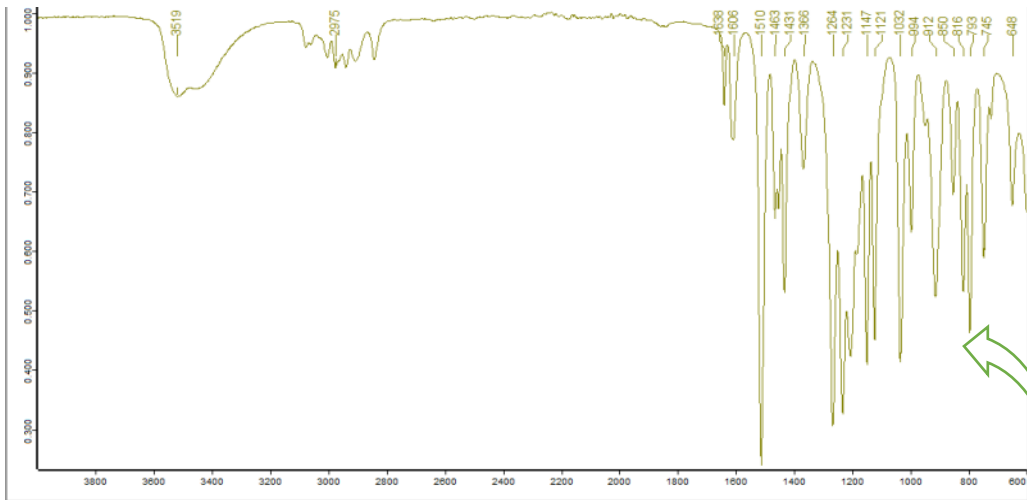
Na kromatogramih (slika 36) je večje število vzorcev, vsi pa so pridobljeni z izolacijo z mikrovalovi, a so odvzeti v različnih stopnjah procesa ekstrakcije (po različnem časovnem obdobju, po dodatku topila).

Pri vzorcih, ki sem jih pridobila s pomočjo izolacije z mikrovalovi, so lise veliko bolj podobne tistim pri vzorcu 3 in 4, kot pa čistemu evgenolu. To nam zopet pove, da je izolacija sicer uspela, a je produkt

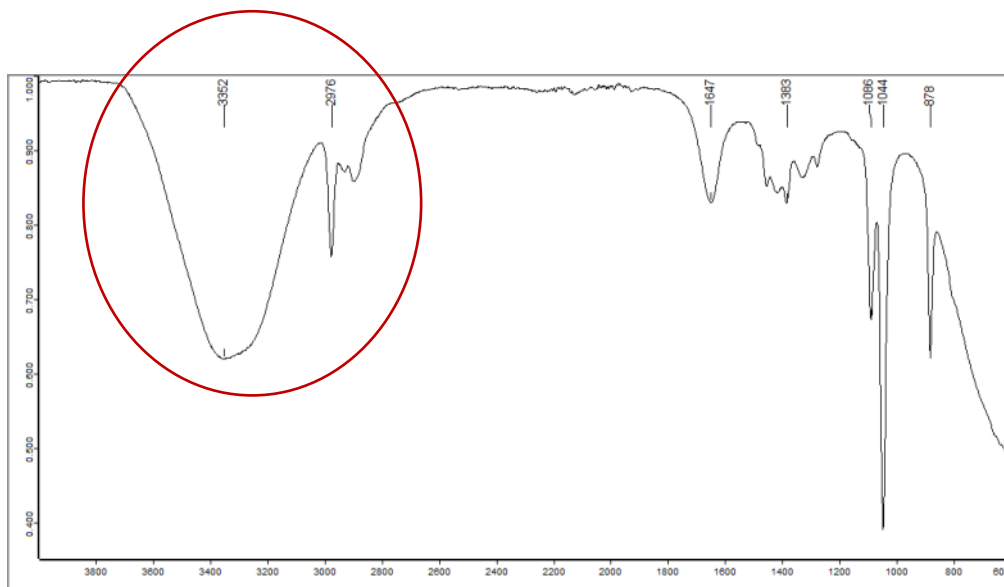
zelo nečist. Opazimo lahko rahlo odebelitev in potemnitev lise na območju, kjer je prisoten evgenol, kar je meni pomemben dokaz, da je ekstrakcija uspela. Pri tej metodi je sicer bila izvedena kislinsko-bazna ekstrakcija, a je bila zaradi zelo majhnih količin težko in verjetno tudi precej slabše izvedena, kar pojasni veliko količino primesi.

IR SPEKTRI

IR spektri so mi omogočili precej dobro identifikacijo pridobljenih produktov po različnih metodah izolacije, a je bilo predhodno potrebno pridobiti precej teoretične podlage, razumeti in dobro preučiti spektre. Lotila sem se analize spektrov vseh produktov, a se bom na tem mestu podrobneje posvetila rezultatom oz. spektrom čistega evgenola, produkta parne destilacije, produkta ekstrakcije po Soxhletu in produkta izolacije z mikrovalovi. Na splošno lahko rečem, da sem lahko v vseh spektrih zaznala vsebnost zelene komponente – evgenola. Dejstvo je, da je zelo težko analizirati rezultate, saj je produkt nečist, in še večja, kot je molekula, več različnih možnosti nihanj obstaja. Posledično je skoraj nemogoče določiti, kateremu nihanju pripada določen absorpcijski trak. Z IR spektri sem lahko določila, katere vezi in katere funkcionalne skupine so prisotne v vzorcu. Pri vseh spektrih je potrebno biti pozoren na topila, saj lahko imajo topila vrhove pri istih valovnih številih (recipročna vrednost valovne dolžine) kot evgenol. Če se vrhovi topila prekrivajo z vrhovi evgenola, jih je potrebno jemati z rezervo. V nadaljevanju so predstavljeni spektri (prvotno na str. 36), in sicer spekter čistega evgenola (1), spekter evgenola pridobljenega s parno destilacijo (2), produkta po ekstrakciji trdno – tekoče po Soxhletu (3) in izolaciji z mikrovalovi (4).



Spekter produkta
parne destilacije
je skoraj
popolnoma enak
spektru 99 %
evgenola.



V spektrih ugotavljamo prisotnost funkcionalnih skupin v območju $4000\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$. V tem območju lahko pri vseh spektrih zaznamo absorpcijski vrh pri približno 3500 cm^{-1} in naslednjega pri 2900 cm^{-1} . Če si spekter ogledamo natančneje, lahko opravimo natančno identifikacijo neke snovi. S spektrom lahko potrdimo, da je v končnih produktih prisotna dvojna vez in fenolna skupina -OH , kar sta značilnosti evgenola. Če pogledamo natančneje, vidimo, da sta spektra pri čistem evgenolu in evgenolu kot produktu parne destilacije skoraj popolnoma identična in to tudi v najbolj občutljivem območju prstnega odtisa. S tem lahko identificiramo spojino, ki smo jo pridobili in lahko zagotovo potrdimo, da je naš produkt skoraj čisti evgenol. Posledično lahko iz tega grafa najboljše odčitamo pričakovanja oz. skupine, ki bi jih praviloma morali najti tudi na spektrih produktov pridobljenih z drugimi metodami. Pri drugih dveh spektrih v prvem delu sicer opazimo enake absorpcijske vrhove, toda območje prstnega odtisa je, razen nekaterih najvišjih vrhov aromatskih spojin (4 vrhovi), precej različno. Dokazali smo, da smo v osnovi sicer uspeli pridobiti evgenol, a so v snovi prisotne še različne druge snovi. Zaradi prisotnosti topil je tudi precejšnja možnost, da so vrhovi prekriti z vrhovi topil. S spektri sicer lahko dokažemo, da smo izolirali evgenol, a zaradi nečistih produktov v nekaterih metodah ekstrakcije se lahko vrhovi med seboj prekrivajo in je določitev manj optimalna ter zato ne zadostuje za potrditev vsebnosti evgenola. IR spektri produktov vseh ostalih metod se vsaj po območju prstnega odtisa občutneje razlikujejo od čistega evgenola. Imajo pa več podobnosti med sabo. K temu lahko prištevam prisotnost acetil evgenola in ostalih snovi v osnovi prisotnih v eteričnem olju klinčkov in pa topila, ki ni popolnoma odstranjen iz snovi.

4.1 Težave pri procesu raziskovanja

Največje in največ težav se je pojavilo pri izolaciji produkta z mikrovalovi. Ta metoda mi je bila pred začetkom tega raziskovanja popolnoma neznana, zato je bilo potrebno veliko predpriprav, ki pa so nato le delno pomagale pri delu. Pri nas ta metoda še ni v tako vsakdanji uporabi in tako široko dostopna kot morda v tujini in večina literature je v tujem jeziku. Dejstvo pa je, da te metode vsaj dandanes nihče več ne izvaja z gospodinjstvo mikrovalovno pečico. Danes se izolacija z mikrovalovi izvaja v posebej ustvarjenih napravah, ki se pravzaprav ne razlikujejo občutneje od navadne mikrovalovne pečice, a kljub temu preveč, da bi lahko delali po enakih postopkih. Nove naprave imajo posebno odzračevanje in imajo v bistvu delno znotraj običajne mikrovalovne pečice postavljen del naprave za destilacijo in le prepuščajo mikrovalovom, da opravljajo gretje vzorca. Nekatere še sodobnejše pa delujejo na podoben način kot centrifuga v mikrovalovni pečici, kjer imajo vzorce v posebnih posodah oz. epruveh. V teh napravah ne pride do preveč povišanega tlaka znotraj

posode, kar povzroči, da se le-ta na silo odpre, prav tako ni nevarnosti izhajanja hlapov, vretja ali razlivanja tekočih vzorcev, prevelikega izhlapevanja topila ipd., kar so težave, s katerimi sem se soočala pri svojem delu. Morala sem prilagoditi postopek, ki je bil pripravljen za neko sodobno napravo, za delo v vsakdanji gospodinjski mikrovalovni pečici. Težave so se pojavile že pri samem določanju parametrov, pri katerih bi morala izolacija potekati. Navodila za laboratorijske mikrovalovne naprave mi pri tem seveda niso bile v veliko pomoč, zato je bilo potrebno ugotoviti primerne nastavitve s poskušanjem. Le-te sem poskušala ugotoviti tako, da sem v mikrovalovni pečici segrevala posodo z vodo in po pretečenem določenem času izmerila temperaturo in jo primerjala s temperaturo, določeno v literaturi. Tako sem določila stopnjo, na katero sem morala nastaviti mikrovalove, da se je vzorec dovolj segrel in je lahko potekala ekstrakcija. Ko sem prišla do teh nastavitvev, pa sem bila zaradi tehničnih težav prisiljena menjati mikrovalovno pečico in sem morala parametre določiti še enkrat. Ko sem začela izvajati poskuse z etanolom in vodo, ki predstavljata topilo, ki sem ga potrebovala, sem se hitro srečala s težavo prekomernega izhlapevanja topila. Prav tako mi je težavo povzročala tudi izbira primerne količine topila in klinčkov ter kje oz. v čem naj ekstrakcijo sploh izvajam. Epruveta ni bila primerna, saj je zaradi majhnega volumna topilo prehitro izhlapelo, če pa je bila zaprta, je tlak prehitro narastel in jo odprl. Poskus ni uspel niti s pokrito čašo ali posodo, prilagojeno za gospodinjske mikrovalove pečice. V obeh primerih nisem uspela pridobiti zelenega produkta. Ko sem uspela nastaviti primerne parametre, določiti primerne količine vseh prisotnih snovi, je ekstrakcija sicer uspela, a je to zahtevalo veliko porabo časa in truda. Zaradi velikega števila poskusov sem zato vzorce za nadaljnje analize odvezemala iz različnih stopenj procesa, preprosto iz strahu, da bi v nadaljevanju procesa izgubila zeleni produkt. Zato so na kromatogramih različni vzorci, vsi pridobljeni s pomočjo mikrovalov, in je bilo narejenih več IR spektrov.

Pri drugih postopkih ni prihajalo do občutnejših težav, največjo oviro je najverjetneje predstavljala le velika poraba časa za vse izmed metod, kar je zahtevalo določene daljše dneve raziskovanja.

5 DISKUSIJA

Razprave svojega raziskovalnega dela se bom lotila s pomočjo pred začetkom dela zastavljenih hipotez, nato pa bom zapisala svoje ugotovitve in domneve.

1. HIPOTEZA: Evgenol predstavlja spojino, pomembno za pridobivanje novih produktov, velike so možnosti nadaljevanja raziskav na področju medicine in farmacije. DA

To hipotezo lahko potrdim že samo po pregledu vse zbrane strokovne literature. Evgenol je zelo razširjena in pomembna spojina našega vsakdanjega življenja, čeprav se je večinoma sploh ne zavedamo. Najdemo jo v medicini, zobozdravstvu, prehrabeni industriji, farmaciji, parfumeriji, veterinarstvu in je zelo uporaben v raziskovalne namene. Deluje protimikrobno in je antioksidant, kar predstavlja zelo pomemben del pri preprečevanju pogostih bolezni, kot so rak, sladkorna bolezen, Parkinsonova bolezen idr. Evgenol je kljub njegovi nepoznanosti izjemno pomembna spojina, ki ima številne odkrite in še neodkrite potenciale. Omogoča tudi pridobivanje novih produktov in ima predvsem obilo možnosti za nadaljnje raziskovanje, tako njegove izolacije, kot tudi uporabe in delovanja. (str. 12–13)

2. HIPOTEZA: Največji izkoristek in najčistejši produkt pridobimo s parno destilacijo. DA/NE

To hipotezo lahko delno potrdim, delno pa ovržem. Res je, da sem s parno destilacijo pridobila najčistejši produkt, kar sem dokazala z IR spektrom, ki je skoraj popolnoma enak spektru čistega evgenola, in s tankoplastno kromatografijo. Z izračunom retencijskih faktorjev in samim izgledom kromatograma sem pridobila še en dober dokaz, da sem s parno destilacijo pridobila čist, kvaliteten produkt. Ni pa res, da ima ta postopek največji izkoristek. Glede na ostale metode ima namreč ta postopek najmanjši izkoristek. Res pa je, da so vsi ostali produkti precej manj čisti oz. vsebujejo veliko drugih prisotnih snovi. Prisotnost le-teh sicer res poveča izkoristek, a v tem primeru je izkoristek drugotnega pomena, saj če smo pridobili nečist produkt, nismo s tem dosegli nič več in nam ne predstavlja prednosti. Temu je tako, ker bi bilo potrebno za očiščenje produkta izvesti dodatne postopke, porabiti nove kemikalije, dodatni časa. V tem primeru menim, da je bolje, da poskrbimo za kvaliteto produkta, če vemo, da izkoristka ne moremo drastično povečati in nam bo dodatno delo povzročilo le stroške in porabo časa.

3. HIPOTEZA: Izolacija evgenola iz klinčkov je možna z gospodinjsko mikrovalovno pečico. Proces je hiter, končni produkt kvaliteten. DA/NE

Tudi s to hipotezo se lahko le delno strinjam. Izolacija evgenola iz klinčkov je možna tudi z gospodinjsko mikrovalovno pečico. To dejstvo lahko potrdim. Sicer je metoda oz. postopek ustvarjen za laboratorijsko predelane in prilagojene mikrovalovne naprave. V preteklosti je morda še potekala takšna ekstrakcija z gospodinjskimi mikrovalovnimi pečicami, a literature za takšen postopek nisem našla niti v tujem jeziku. Če čas potreben za ekstrakcijo z mikrovalovi, primerjamo s tistimi, ki so potrebni za ostale postopke ekstrakcije, je proces resnično hiter. S to metodo lahko izoliramo končni produkt, a njegova kvaliteta ni najboljša. Veliko je prisotnih ostalih snovi in nečistoč, metoda kislinsko-bazne ekstrakcije za izolacijo oz. očiščenje produkta pa ni najbolj primerna. Zaradi vsega navedenega se torej s to hipotezo ne strinjam popolnoma.

PRVE/HITRE UGOTOVITVE

Če najprej omenim nekatere prve hitre ugotovitve, ki sem jih pri delu in ob koncu dela takoj opazila. Z vsemi metodami mi je uspelo iz klinčkov izolirati spojino evgenol, a je bilo med samimi metodami kot

tudi med končnimi produkti precej razlik. Najprej lahko omenim porabljen čas. Parna destilacija, navadna destilacija in ekstrakcija trdno-tekoče po Soxhletu so precej dolgotrajni postopki. V povprečju je bilo za vsakega izmed njih potrebno približno 6 ur, ekstrakcije so potekale precej počasi. Pri maceraciji je bilo potrebnega še več časa, in sicer 6 ur samo za stresanje, nato pa 18 ur stanja raztopine v temnem prostoru. Vse štiri metode so sicer učinkovite, a sem se pri delu želela rešiti problema zelo velike porabe časa. Zaradi tega sem se odločila za preizkušnjo izolacije z mikrovalovi. Ta ekstrakcija je trajala 20 minut, prav tako pa sem izolirala končni produkt.

Vsi pridobljeni produkti pa so se sicer po izgledu med sabo občutno razlikovali. Produkt parne destilacije je izgledal tako, kot izgleda čisti evgenol (bledo rumena oljnata tekočina z izrazito aromo). Pri navadni destilaciji je bil vonj veliko manj izrazit, produkta je bilo več in bil je brez barve. Pri maceraciji in ekstrakciji trdno-tekoče po Soxhletu pa sem dobila produkta močnega vonja in temno rjavega obarvanja, precej večje gostote kot produkta po prvih dveh metodah. Ta dva produkta sta bila precej manj čista kot produkta obeh destilacij, zato ju je bilo potrebno pred njuno nadaljnjo uporabo še dodatno prečistiti. Sama sem se poslužila le postopka filtracije.

PRIMERJAVA METOD IZOLACIJE

Že pri prvih ugotovitvah sem omenila razliko v času potrebnem za izolacijo evgenola, in pa razlike v izgledu končnega produkta, zdaj pa se želim posvetiti namenu raziskave, ki je v bistvu primerjava metod, njihova primernost in učinkovitost. Najbolj kakovosten produkt nam še vedno prinese destilacija z vodno paro, ki je temu pravzaprav namenjena. Njen namen je namreč ekstrahirati organske snovi, ki so občutljive na povišane temperature, iz nekega biološkega materiala. Produkt po tej metodi je bil daleč najbolj čist in skoraj popolnoma enak 99 % čistemu evgenolu, kar sem dokazala tako s tankoplastno kromatografijo kot tudi z IR spektri.

Menim, da je na splošno najboljša metoda za ekstrakcijo evgenola iz klinčkov parna destilacija. Res pa je, da to metodo ne morem opredeliti kot najhitrejšo. To nam brez dvoma predstavlja izolacija z mikrovalovi. V tem raziskovalnem delu sem se prvič spoznala z laboratorijskim delom z mikrovalovi in rečem lahko, da je bilo delo precej bolj zapleteno, kot se je zdelo na prvi pogled. Ker izolacija evgenola z mikrovalovi v gospodinjski mikrovalovni pečici ni metoda v uporabi oz. o njej ni poznane literature, je bilo potrebno postopek iz sodobne MAE naprave prilagoditi preprosti mikrovalovni pečici. Za to je bilo potrebnega veliko truda in prej vloženega časa. Sam potek izolacije je bil drugače prepričljivo najhitrejši, veliko časa pa je vzelo določanje parametrov in predpriprava. Glede na potreben inventar bi lahko rekli, da je ta metoda najpreprostejša. Poraba energije, časa in pa tudi materiala (topila in vzorca) je najmanjša od vseh metod, kar posledično pripelje tudi do dejstva, da je metoda najcenejša. Menim, da v primeru izolacije takšne spojine, kot je evgenol, najpomembnejše vloge ne igra izkoristek. Seveda se pri delu trudimo za najvišji možni izkoristek, kar nam omogoča varčevanje s časom, energijo, denarjem in materialom, a glede na to, da sem pri svojem delu preizkusila pet različnih metod dela, bi želela poudariti nekaj drugega. Vse metode so imele izkoristek precej višji od tistega, ki ga je imela metoda parne destilacije. Toda dejstvo je, da so bili vsi ostali produkti precej manj čisti, vsi so imeli prisotne neke dodatne spojine, ki bi jih bilo potrebno iz teh vzorcev izločiti. Za to bi bile potrebne dodatne kemikalije, dodatni postopki, dodatna energija in čas, kar bi na koncu pripeljalo do tega, da nam kljub manjšem izkoristku bolje kaže, če izvajamo postopek, ki nam prinese kvaliteten, čist produkt, kot pa da zapravljamo čas z metodami, čigar produkte bo potrebno popravljati, čistiti in ponovno izolirati. Lahko pa se potrudimo, da povečamo izkoristek, ob enem pa ohranjamo kvaliteto končnega produkta. Če želimo povečati izkoristek katerekoli izmed metod, je najpreprostejša rešitev,

da vzorec zmeljemo. S tem povečamo površino, na katero lahko deluje topilo, in iz nje ekstrahira neko določeno snov. Pri maceraciji smo izkoristek reakcije povečali s tem, da smo vzorec v topilu stresali. Še dodatno bi ga lahko povečali s segrevanjem med samim stresanjem, kar bi povečalo in pospešilo ekstrakcijo. Pri svojem raziskovalnem delu sem maceracijo izvedla dvakrat, enkrat sem izhodni material za ekstrakcijo zmlela z mlinčkom za kavo, drugič pa sem klinčke pustila cele. Prišlo je do majhne razlike v izkoristku, po vseh analizah pa sta si bila produkta med sabo enaka. Najbolj kvalitetna produkta smo pridobili z obema destilacijama, a je pri navadni destilaciji količina pridobljenega evgenola precej manjša. Čeprav je izkoristek metode večji pri navadni destilaciji, je v produktu precej manjša količina evgenola ali pa je produkt bolj razredčen. To lahko razberemo iz IR spektrov in iz tankoplastne kromatografije. Iz kromatograma lahko namreč takoj opazimo, da je lisa, ki predstavlja evgenol, precej manjša in precej svetlejša kot pri parni destilaciji. Pri IR spektrih to razberemo s primerjavo absorpcijskih trakov.

Če se osredotočim še na samo škodljivost metod za okolje in človeka. Pri vsaki izmed metod je potrebna uporaba kemikalij, ki škodujejo človeku. Kemikalije so dražljive, jedke ali celo rakotvorne, zato so pri vseh metodah potrebni zaščitni ukrepi. Najmanj nevarnosti človeku je sicer predstavljala maceracija, kjer je bilo prisotnih najmanj nevarnih kemikalij razen metanola, saj ni bila izvedena kislinsko-bazno ekstrakcija, niti ni bilo potrebnega segrevanja. Ta metoda je torej človeku in tudi okolju najbolj prijazna. Pri ostalih so bile nevarnosti večje, za nobeno od teh metod pa ne moremo reči, da je popolnoma neškodljiva.

MOŽNOSTI NADALJNEGA RAZISKOVANJA

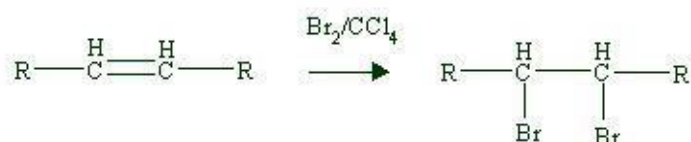
Menim, da se s to raziskavo odpirajo še številna druga vprašanja in bi lahko delo nadaljevali v marsikatero smer. Iz pridobljenega produkta bi lahko pridobila vanilin, kot so ga prvič umetno sintetizirali v preteklosti. To je bil tudi delno moj namen te raziskave, a sem pred dokončno odločitvijo ugotovila, da so kemikalije precej nevarne in človeku ter naravi škodljive, poleg tega pa bi bilo potrebno tudi naknadno naročanje kemikalij. Posledično sem idejo opustila. Okrnjeno lahko razložim, da sinteza temelji na izomerizaciji dvojne vezi evgenola, pri čemer nastane izoevgenol, in nadaljnji oksidaciji premeščene dvojne vezi do vanilina. Kot oksidant uporabimo nitrobenzen, ki je dovolj blag, da ne oksidira fenolne skupine.

Med svojim raziskovanjem sem največ truda in časa porabila za prilagoditev metode izolacije z mikrovalovi v gospodinjski mikrovalovni pečici. Izolacija produkta je sicer uspela, a je produkt precej slabše kvalitete, razredčen in poln nečistoč, pojavljajo pa se tudi težave pri njegovem čiščenju. Želela bi še bolj prilagoditi to metodo, da bi izolirala čistejši in kvalitetnejši produkt. Delo bi morda lahko opravljala tudi z večjimi količinami, s čimer bi si omogočila lažje čiščenje produkta s kislinsko-bazno ekstrakcijo. Prav tako bi se lahko več ukvarjala s samim čiščenjem produkta npr. s količinami potrebnih kemikalij in načinom ekstrakcije. Od vseh metod mi je namreč ravno ta predstavljala največji izziv, ki bi ga bilo zanimivo čim bolj razrešiti. Čeprav sem dosegla svoj namen in je bila izolacija uspešna, menim, da so pri tej metodi možne še številne izboljšave.

Možno je tudi nadaljevanje raziskovanja na področju dviga izkoristka metod. Pri tem bi se bilo pametno osredotočiti predvsem na tiste metode, kjer je bil končni produkt najčistejši in najkvalitetnejši. Če bi namreč uspelo povišanje izkoristka izolacije s parno destilacijo, bi bil to velik uspeh, saj bi lahko pridobili večjo količino zelo kvalitetnega produkta, ki se po sestavi popolnoma približa 99 % evgenolu. S tem bi zmanjšali količino potrebnega rastlinskega materiala za izolacijo neke

količine evgenola, zmanjšali potrebne količine topil in energijsko porabo. Posledično to pripelje do znižanja stroškov dela.

Za pomoč pri določanju evgenola bi lahko izvedla tudi dokazne reakcije. Evgenol je namreč primer naravnega arena, fenola, nenasičene spojine in alkil-aril etra. Z adicijo broma na dvojno vez, pri čemer bi se raztopina broma v tetraklorometanu razbarvala, bi dokazali nenasičenost raztopine (slika 37). Za dokaz nenasičenosti pa bi lahko izvedli tudi oksidacijo alkena v diol s KMnO_4 (slika 38).



Slika 37: Adicija broma na dvojno vez



Slika 38: Oksidacija alkena

S Friedel-Craftsovo reakcijo bi lahko dokazali aromatičnost (elektrofilna substitucija), fenole pa bi lahko dokazali z raztopino FeCl_3 , s katero fenoli tvorijo kompleks, delno pa pride do oksidacije. Kot dokaz dobimo obarvan produkt. [13] Morda bi bilo kot del raziskave še pred drugimi analizami zanimivo izvesti te dokazne reakcije, ki bi verjetno najbolj pomagale pri analizi vzorca, pridobljenega z izolacijo z mikrovalovi, saj skozi celoten proces nisem mogla biti prepričana o tem, da sem ekstrahirala produkt oz. ali je pridobljen produkt sploh to, kar sem želela.

Zanimivo bi bilo tudi, da bi poskušala evgenol pridobiti iz nekaterih drugi naravnih virov npr. cimeta in nato primerjati kakovost pridobljenega produkta. Za izkoristke lahko že predhodno rečem, da je njihova primerjava nesmiselna, saj je količina zelenega produkta v drugih začimbnicah precej manjša. Bi bil pa zanimiv del raziskave, kako iz rastlinskega materiala izločiti neko spojino, ki ne predstavlja večinskega in pomembnejšega dela le-tega.

Menim, da ima to celotno raziskovalno delo še številne možnosti za napredek, izboljšave in nadaljevanje raziskovanja, kar predstavlja dober izziv za prihodnost. Poleg že naštetih možnosti nadaljnjih raziskav, verjamem, da obstajajo še številne druge možnosti, ki jih bom v prihodnosti morda preučila in preizkusila.

6 ZAKLJUČEK

Pred začetkom raziskovanja še nisem nikoli slišala za spojino, imenovano evgenol. Nenavadno dejstvo, glede na to, kako pomembna, uporabna in koristna spojina je. Skozi raziskovanje sem se najprej spoznala s številnimi teoretičnimi osnovami, tako tistimi o klinčkih in evgenolu, kot tudi o petih različnih metodah izolacije te snovi iz nekega organskega materiala. Literatura mi je prinesla ogromno znanja, kar mi je omogočilo razumevanje dobljenih končnih rezultatov. Osvojila sem lahko številne metode dela in se spoznala z nekaterimi novimi, zame nevsakdanjimi, kot je na primer kislinsko–bazna ekstrakcija ali IR spektroskopija. Bistvo pa je, da sem lahko med sabo primerjala metode izolacije, spoznala, katera je najprimernejša, katera nam ponudi najvišji izkoristek, katera je najhitrejša in katera najmanj škodljiva okolju ter človeku. Kljub temu, da je bila naporna in večkrat obsojena na neuspeh, je bila moj najljubši del te raziskave ravno izolacija z mikrovalovi. Prisiljena sem bila ustvariti svojo metodo in določiti svoje parametre, saj ni v nobeni literaturi napisano, kako bi lahko izvajala izolacijo evgenola iz klinčkov z gospodinjsko mikrovalovno pečico. Čeprav mi je to vzelo veliko časa in truda, je to tisto pravo raziskovanje in ne obžalujem vseh za to porabljenih ur. Pridobila sem veliko znanja, izkušenj in spoznala, da tudi po več desetih neuspešnih poskusih ne smeš obupati, ker na koncu vedno nekako najdeš rešitev. Primerjala sem lahko izkoristke, izvajala kromatografije, analizirala IR spektre in povezovala znanje, ki sem ga pridobivala že več let.

Evgenol je aromatska spojina neverjetnega potenciala, prav tako pa so široke tudi možnosti za nadaljnje raziskovanje, ki bi ga ob primerni priložnosti z veseljem nadaljevala. Če pomislim le na tisto, kar se lahko ustvari v šolskem laboratoriju: iz evgenola lahko sintetiziramo vanilin ali katero drugo spojino, lahko iščemo rešitve za povišanje izkoristkov določenih metod, lahko iščemo nove alternativne metode, kot je na primer delo z mikrovalovi ali poskušamo pridobiti evgenol tudi iz nekaterih drugih rastlinskih virov. V širšem spektru pa so možnosti uporabe evgenola v medicini in farmaciji odprte in snov iz nekaj tako preprostega kot je klinček, lahko spremeni marsikaj v sodobni prehrani, zdravstvu in še na marsikaterem drugem področju življenja. Prav tako lahko rečem, da je delo z mikrovalovi res nekaj, kar lahko pospeši in olajša številne procese v kemijskih laboratorijih, torej so z mikrovalovi podprti procesi morda res procesi prihodnosti.

7 VIRI IN LITERATURA

7.1 Vsebinski viri

- [1] *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. [Online]. *sciencedirect.com*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967300009213> (Datum dostopa: 29. 2. 2020).
- [2] *Biološko pomembne spojine-evgenol*. [Online]. *fkkt.uni-lj.si*. Dostopno na spletnem naslovu: https://www.fkkt.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/1-O_fakulteti/7-Zalo%C5%BEba/Knjige/2019-Biološko_pomembne_spojine-GKP-kazalo.pdf (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [3] *Destilacija*. [Online]. *eucbeniki.sio.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://eucbeniki.sio.si/nar7/979/index5.html> (Datum dostopa: 1. 11. 2019).
- [4] *Dišeči klinčevc*. [Online]. *pomurske-lekarne.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.pomurske-lekarne.si/tocka-zdravja/klincevec-diseci-syzygium-aromaticum> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [5] Dolenc, D. (2018). *Vaje iz organske analize: navodila za laboratorijske vaje: [praktikum]* (str. 45, 59–63, 73–74, 82–89, 98–100). 2., dopolnjena izd., 3. natis. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- [6] *Ekstrakcija z organskimi topili*. [Online]. *www.knjiznica-celje.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201203874.pdf> (Datum dostopa: 27. 2. 2020).
- [7] *Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives*. [Online]. *pubs.rsc.org*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2017/ra/c7ra04803c> (Datum dostopa: 24. 2. 2020).
- [8] *Eugenol*. [Online]. *cms.galenos.com.tr*. Dostopno na spletnem naslovu: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_16077/201-206.pdf (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [9] *Eugenol analytical methode*. [Online]. *ijpcs.org*. Dostopno na spletnem naslovu: http://ijpcs.org/admin/php/uploads/163_pdf.pdf (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [10] *Eugenol*. [Online]. *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eugenol> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [11] *Eugenol*. [Online]. *sciencedirect.com*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/eugenol> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [12] *Evgenol*. [Online]. *food-info.net*. Dostopno na spletnem naslovu: <http://www.food-info.net/si/qa/qa-wi27.htm> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [13] *Evgenol*. [Online]. *keminfo.pef.uni-lj.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <http://keminfo.pef.uni-lj.si/etolja/eksng.htm> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [14] *Evgenol*. [Online]. *keminfo.pef.uni-lj.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <http://keminfo.pef.uni-lj.si/etolja/evgenol.htm> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).

- [15] *Evgenol*. [Online]. *keminfo.pef.uni-lj.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <http://keminfo.pef.uni-lj.si/ro01k/evgenol/evgenol.htm> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [16] *Evgenol*. [Online]. *nasa-lekarna.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.nasa-lekarna.si/clanki/clanek/praznik-si-zapomnimo-po-vonju/> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [17] *Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives*. [Online]. *pubs.rsc.org*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2017/ra/c7ra04803c> (Datum dostopa: 24. 2. 2020).
- [18] *Extraction of Eugenol from Cloves*. [Online]. *tools.thermofischer.com*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://tools.thermofischer.com/content/sfs/brochures/pS45-pS80-Extraction-of-Eugenol-from-Cloves.pdf> (Datum dostopa: 24. 2. 2020).
- [19] *Farmakopeja*. [Online]. *jazmp.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.jazmp.si/farmakopeja/> (Datum dostopa: 30. 10. 2019).
- [20] *IR spektri*. [Online]. *keminfo.per.uni-lj.si*. Dostopno na spletnem naslovu: <http://keminfo.pef.uni-lj.si/ro03m/ir.htm> (Datum dostopa: 27. 2. 2020).
- [21] *Infrardeča spektroskopija*. [Online]. *sl.wikipedia.org*. Dostopno na spletnem naslovu: https://sl.wikipedia.org/wiki/Infrarde%C4%8Da_spektroskopija (Datum dostopa: 28. 2. 2020).
- [22] *Introducing Organic Chemistry Students to the Extraction of Natural Products Found in Vegetal Species*. *World Journal of Chemical Education*, vol. 5, no. 4 (2017). [Online]. *pubs.sciepub.com*. Dostopno na spletnem naslovu: <http://pubs.sciepub.com/wjce/5/4/5/> (Datum dostopa: 1. 3. 2020).
- [23] *Klinčki*. [Online]. *old.seniorji.info*. Dostopno na spletnem naslovu: http://old.seniorji.info/MOJE_ZDRAVJE_Klincki.html (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [24] *Microwave-Assisted Isolation of Eugenol from Cloves*. [Online]. *pubs.acs.org*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jchemed.8b01022> (Datum dostopa: 29. 11. 2019).
- [25] *Microwave energy potential for biodiesel production*. [Online]. *researchgate.net*. Dostopno na spletnem naslovu: https://www.researchgate.net/publication/237050495_Microwave_energy_potential_for_biodiesel_production (Datum dostopa: 29. 2. 2020).
- [26] *Nageljeve žbice*. [Online]. *sl.wikipedia.org*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Nageljnov%C5%BEbice> (Datum dostopa: 27. 10. 2019).
- [27] Sodja-Božič, J. in Klasinc, M. (1997). *ANALIZNA KEMIJA – FIZIKALNO-KEMIJSKA ANALIZA – Eksperimentalni del*. 1. izd., 3. natis. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za šolstvo.
- [28] *Uporaba evgenola*. [Online]. *ffa.uni-lj.si*. Dostopno na spletnem naslovu: http://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica-doc/diplomske/merkac_maja_dipl_nal_2016.pdf?sfvrsn=2 (Datum dostopa: 29. 10. 2019).

7.2 Viri slik

Slika 1: vsebinski vir [28] (Datum dostopa: 27. 10. 2019)

Slika 2: vsebinski vir [3] (Datum dostopa: 27. 10. 2019)

Slika 3: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201403413.pdf> (Datum dostopa: 29. 11. 2019)

Slika 4: https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor (Datum dostopa: 29. 11. 2019)

Slika 5: vsebinski vir [1] (Datum dostopa: 29. 2. 2020)

Slika 6: vsebinski vir [25] (Datum dostopa: 29. 2. 2020)

Slika 7: vsebinski vir [25] (Datum dostopa: 29. 2. 2020)

Slika 8: vsebinski vir [13] (Datum dostopa: 27. 10. 2019)

Slika 9: vsebinski vir [13] (Datum dostopa: 27. 10. 2019)

Slika 10: <http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/kromatografija/> (Datum dostopa: 27. 10. 2019)

Slika 11: <http://keminfo.pef.uni-lj.si/etolja/ekssiv.htm> (Datum dostopa: 24. 2. 2020)

Slika 12: vsebinski vir [20] (Datum dostopa: 24. 2. 2020)

Slika 13: vsebinski vir [20] (Datum dostopa: 24. 2. 2020)

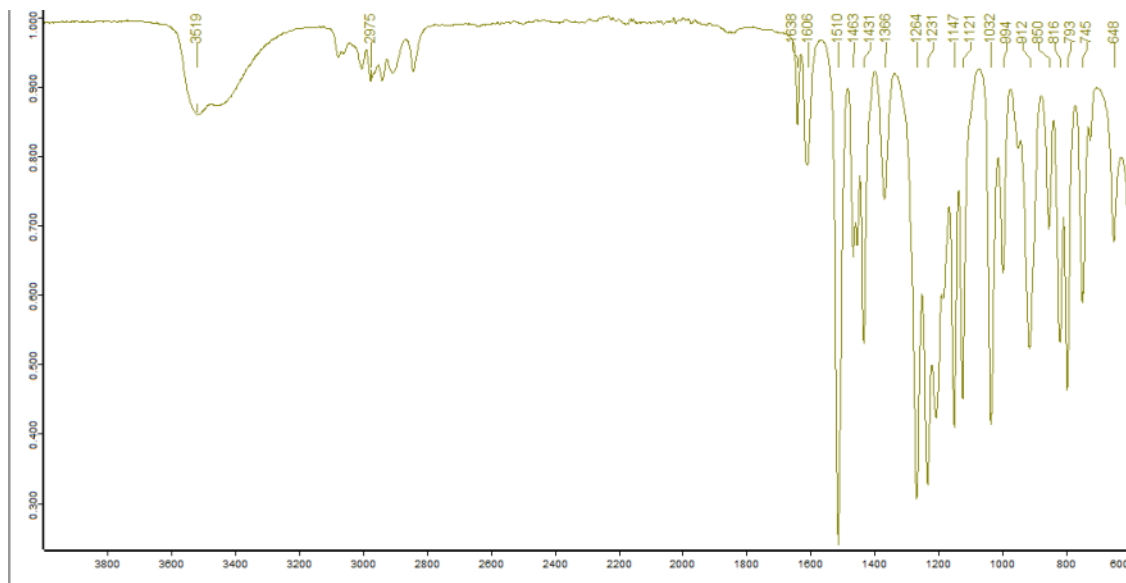
Slika 14–36: lasten arhiv

Slika 37: vsebinski vir [13] (Datum dostopa: 24. 2. 2020)

Slika 38: vsebinski vir [13] (Datum dostopa: 24. 2. 2020)

Priloga 1

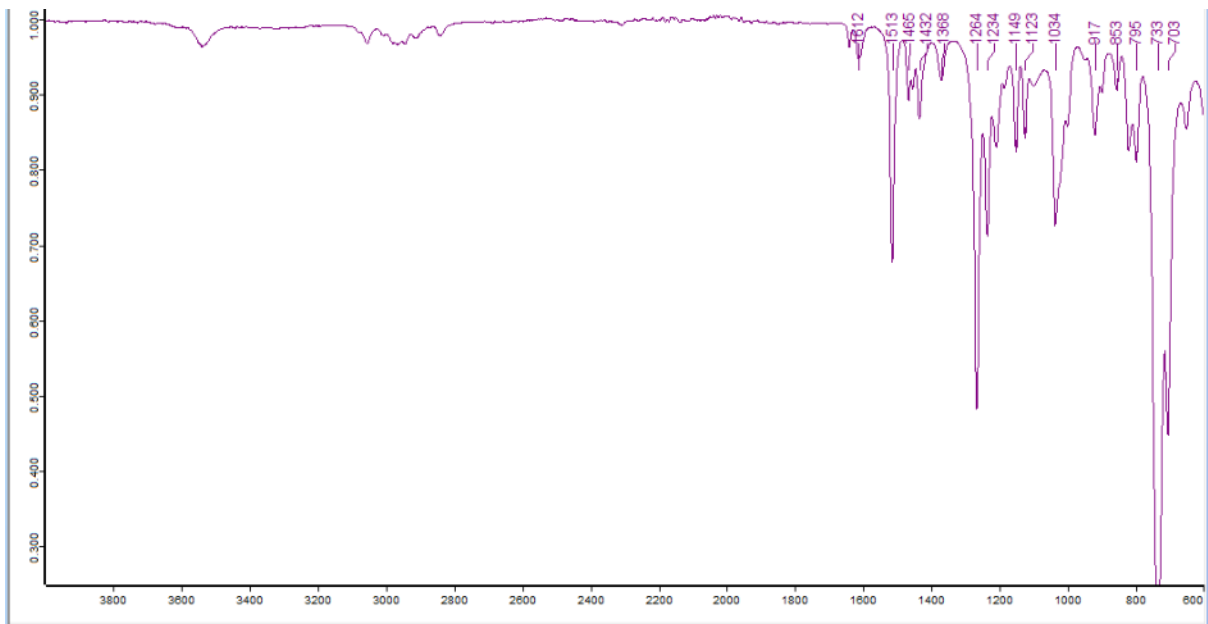
IR SPEKTRI VZORCEV, PRIDOBLJENIH Z RAZLIČNIMI METODAMI



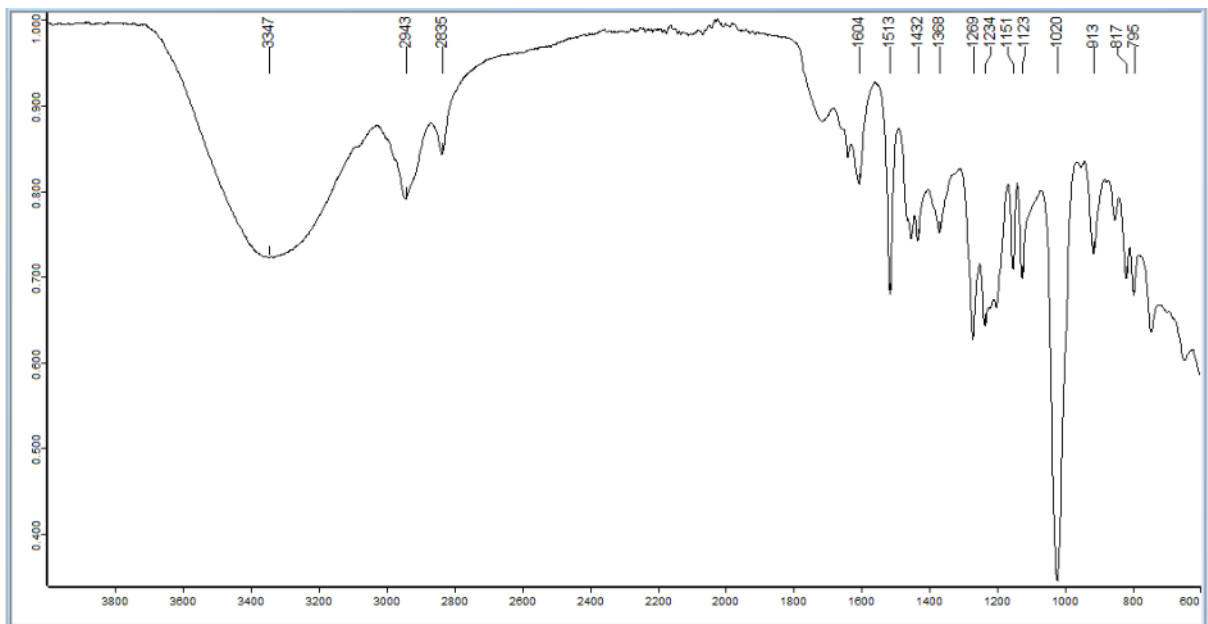
Graf 4: Čisti evgenol



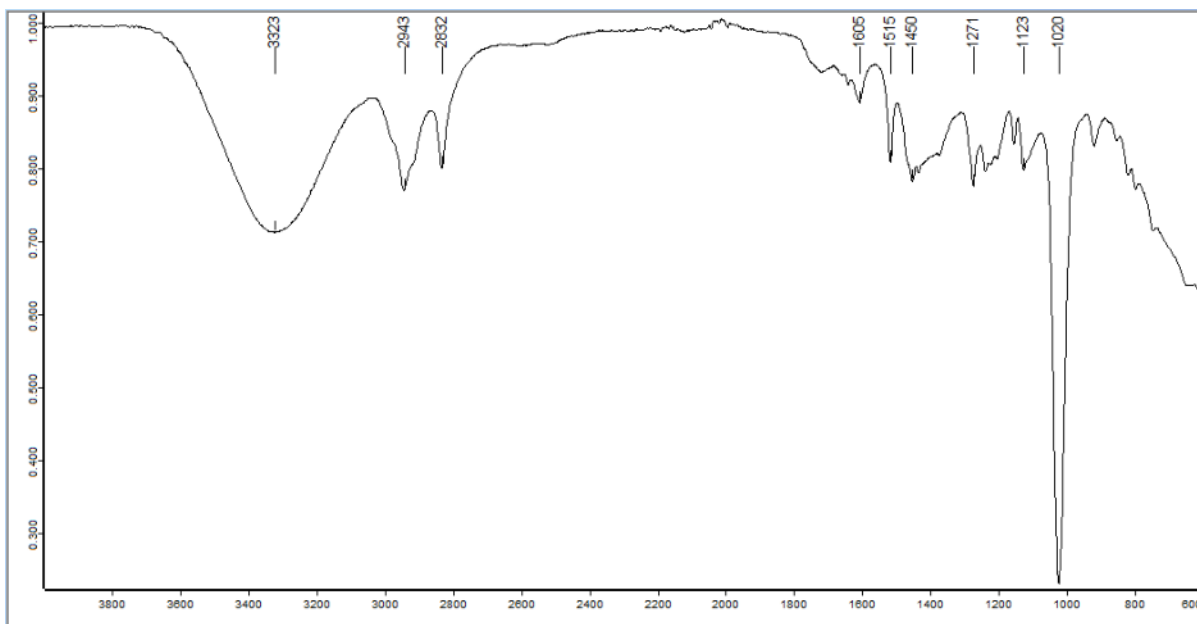
Graf 5: Evgenol – parna destilacija



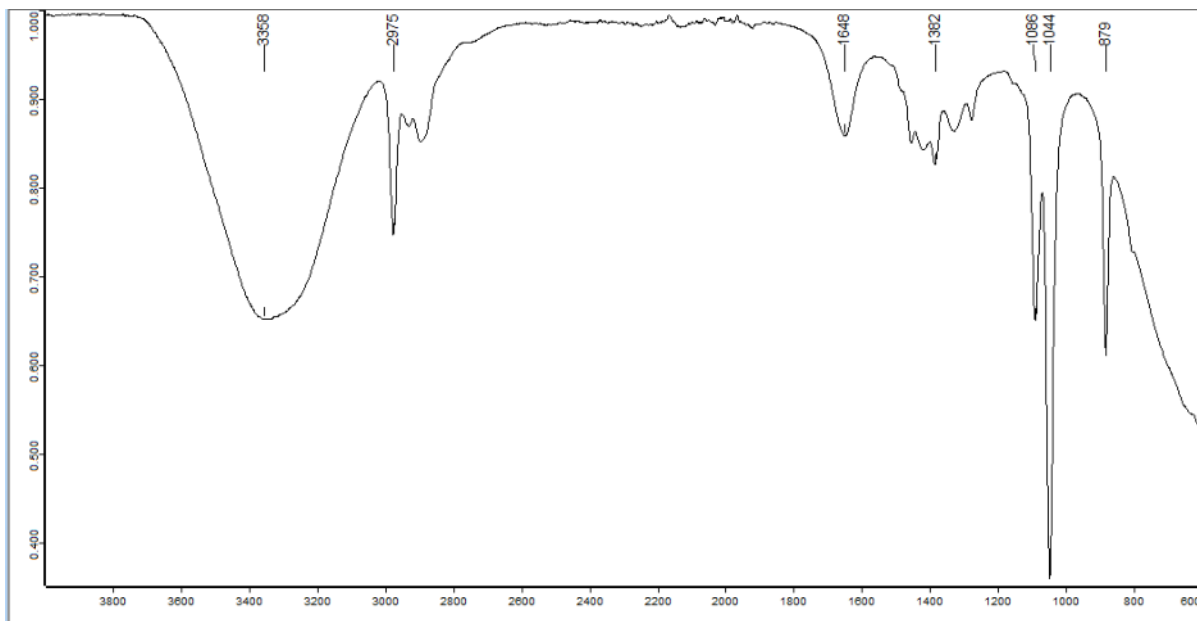
Graf 6: Evgenol – navadna destilacija



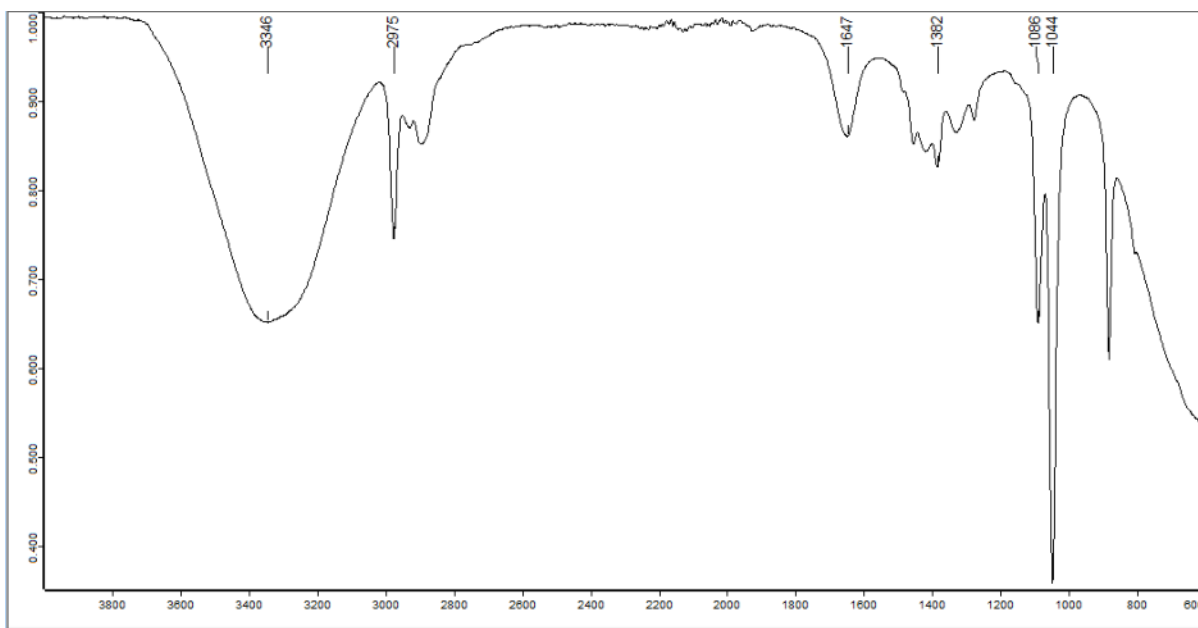
Graf 7: Evgenol – maceracija



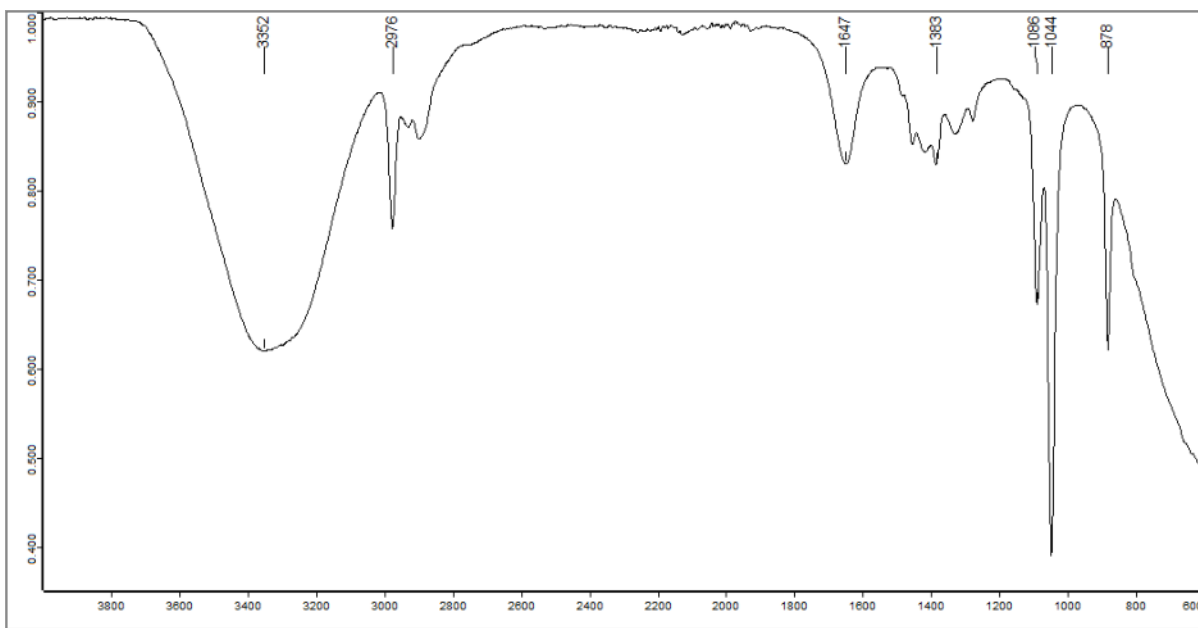
Graf 8: Evgenol – Soxhlet



Graf 9: Evgenol – mikovalovi #1



Graf 10: Evgenol – mikrovalovi #2



Graf 11: Evgenol – mikrovalovi #3

Priloga 2

TABELA ABSORPCIJSKIH VRHOV

Funkcionalna skupina	Vrsta nihanj	Valovno število [cm ⁻¹]
Afilatski alkoholi	Vzdolžna nihanja: O-H	3670 – 3610; širok trak
Nerazredčeni alkoholi		3400 – 3200; širok trak
	Nihanja C-O	- Primarni: 1050 - Sekundarni: 1100 - Terciarni: 1200 – 1150
Fenoli	Vzdolžna nihanja: O-H	3670 – 3610; širok trak
	Aromat	4 trakovi: 1600, 1580, 1500, 1450
Karboksilne kisline	Vzdolžna nihanja: O-H	3570 – 3510
	Nihanja C-O	1300 – 1250
	Nihanje C=O	1710
Estri	Nihanja C-O	1300 – 1100
	Nihanje C=O	1735 - Fenilni in vinilni estri: 1760
Anhidridi	C = O	2 trakova: 1810 in drugi 60 nižje
Amini: - Primarni - Sekundarni - Aromatski	Vzdolžna nihanja: N-H	Splošno: 3500 – 3400 - Primarni: 3400 – 3280; dva trakova cca. 80 narazen - Sekundarni: 3300; 1 šibek trak - Aromatski : - primarni.: 3500 – 3350 - sekundarni: 3400
	Prečna nihanja: N-H	1650- 1590
	Nihanje C – N	1220 – 1020; šibka absorpcija
Soli aminov	Vzdolžna nihanja	- Primarni: 3200 – 2800 - Sekundarni: 3000 – 2400

Amidi	Vzdolžna nihanja: N-H	Trdna/ čista snov: - primarni: dublet 3350 in 3180 - sekundarni: 1 trak 3300 3250
	Nihanja C=O:	1685 – 1650
Aldehidi	Vzdolžno nihanje C – H	2820 in 2720; 2 trakova
	C = O	1730; Nenasičeni: 1700 – 1690 Aromatski: 1700
Ketoni Induktivni efekt: I- : višje valovno število Resonančni efekt: M+ : nižje valovno število	C = O	Afilatski : 1720 Aromatski ketoni: 1700 – 1685
Vezi med ogljiki: Enojne vezi Dvojne vezi: - Alkeni - Aromati Trojne vezi: - Alkini	C – C	Enojne vezi : 1250 – 700
	C = C	Alkeni: 1700 - 1600 Aromati: 4 trakovi: 1600, 1580, 1500, 1450
	Trojna vez med ogljiki	2260 – 2100; oster, šibek trak
Alkani Alkeni Alkini	Vzdolžna nihanja C-H:	Sp³ C: 3000 – 2800 Sp² C: 3100 - 3000 Sp C: 3300
	Prečna nihanja	1550 – 650 Sp³ CH₃: 1460 in 1380 Sp³ CH₂: 1460
Nitrili	Trojna vez med C in N	2260 – 2210
Nitro spojine	N-O	Afilatske: 2 trakova; 1550 močnejši in 1380 šibkejši Aromati: 2 trakova 1520 - 1350

IZJAVA*

Mentorica **Mojca Drofenik Čerček** v skladu z 20. členom Pravilnika o organizaciji mladinske raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje, zagotavljam, da je v raziskovalni nalogi z naslovom **Primerjava različnih metod izolacije evgenola iz klinčkov in analiza produktov**, katere avtorica je **Ana Slomšek**:

- 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 dovoljenje in je hranjeno v šolskem arhivu,
- da sme Osrednja knjižnica Celje objaviti raziskovalno nalogo v polnem besedilu na knjižničnih 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, 1.6.2020



Podpis mentorja

M. D. Čerček

Podpis odgovorne osebe

[Signature]

*

POJASNILO

V skladu z 20. 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.