

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Matic PLEŠNIK

LES RDEČEGA BORA KOT VIR PINOSILVINOV

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Matic PLEŠNIK

LES RDEČEGA BORA KOT VIR PINOSILVINOV

MAGISTRSKA NALOGA
Magistrski študij - 2. stopnja

WOOD OF SCOTS PINE AS A SOURCE OF PINOSYLVINS

M. Sc. Thesis
Master Study Programmes

Ljubljana, 2014

Magistrska naloga je zaključek Magistrskega študija Lesarstvo – 2. stopnja. Delo je bilo izvedeno v laboratoriju Delovne skupine za kemijo lesa (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo). Raziskava je nastala v okviru raziskovalnega projekta PINOBIO - Pinosylvins as novel bioactive agents for food applications (WoodWisdom – Net research programme).

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorico magistrske naloge imenoval doc. dr. Ido Poljanšek in somentorja prof. dr. Primoža Ovna, za recenzenta pa prof. dr. Marka Petriča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: doc. dr. Ida Poljanšek

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Primož Oven

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Marko Petrič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo, neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu, preko digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Matic Plešnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK 630*813.2
KG les/rdeči bor/grče/protitočna ekstrakcija/ekstrakti/pinosilvin/HPLC
AV PLEŠNIK, Matic
SA POLJANŠEK, Ida (mentor)/OVEN, Primož (somentor)/PETRIČ Marko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI 2014
IN LES RDEČEGA BORA KOT VIR PINOSILVINOV
TD Magistrska naloga (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP XII, 88 str., 2 pregl., 56 sl., 35 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Na podlagi preliminarnih poskusov smo zasnovali laboratorijsko postavitev petfazne protitočne ekstrakcije, da bi iz lesa ekstrahirali pinosilvine, ki bi lahko bili primerni za uporabo v prehrani. Kot vir iskanih komponent smo uporabili les rdečega bora, iz več dreves na dveh različnih slovenskih rastiščih. Industrijske vzorce grč in jedrovine smo laboratorijsko pripravili kot homogeni granulat. Za topilo smo uporabili destilirano vodo, vodni raztopini etanol/H₂O (50/50, 60/40 (v/v)) ter vodno raztopino aceton/H₂O (95/5 (v/v)). Ekstrakcija je potekala 15 min pri temperaturi vrelišča posameznega topila. Ekstraktom smo z UV-VIS absorpcijsko spektroskopijo določili vsebnost celokupnih fenolov in s HPLC analizo vsebnost pinosilvina (PS) ter pinosilvin monometilnega etra (PSMME). Vsebnost obravnavanih komponent je bila najnižja pri vodnih ekstraktih (grče <13 mg/g, jedrovina <5 mg/g). Najvišjo vsebnost pa smo dosegli z acetonsko ekstrakcijo (grče <35 mg/g, jedrovina <10 mg/g). Medtem ko so etanolni ekstrakti vsebovali: grče <33 mg/g, jedrovina <10 mg/g. Razmerje med ekstrahiranim pinosilvinom in pinosilvin monometilnim etrom je pri vodnih ekstraktih okoli 1:1,5 pri etanolnih in acetonskih ekstraktih pa 1:3. Protitočna ekstrakcija je primerna metoda za pridobivanje pinosilvinov iz lesa borov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC 630*813.2
CX wood/Scots pine/knots/countercurrent extraction/extracts/pinosylvin/HPLC
AU PLEŠNIK, Matic
AA POLJANŠEK, Ida (supervisor)/OVEN, Primož (co-advisor)/PETRIČ, Marko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science
PY 2014
TI WOOD OF SCOTS PINE AS A SOURCE OF PINOSYLVINS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XII, 88 p., 2 tab., 56 fig., 35 ref.
LA sl
AI sl/en
AB On the basis of preliminary research, we have set a laboratory setting of five stage counter-current extraction to extract pinosylvins out of wood. As a source of pinosylvin, we used ground wood tissues of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from different habitats in Slovenia. To simulate an industrial sample, we separately prepared homogenous mixture of milled tissues, knots and heartwood. The samples were extracted with pure distilled water, ethanol/H₂O (50/50, 60/40 (v/v)) and acetone/H₂O (95/5 (v/v)). Each cycle lasted for 15 minutes at boiling temperature of the solvent. Then the extraction efficiency was evaluated gravimetrically. We used UV-VIS spectroscopy to determine the content of total phenols. By using HPLC analysis we determinated the content of pinosylvin (PS) and pinosylvin monomethyl ether (PSMME). Knots were a better source of pinosylvin than heartwood at all solvents used. The content of te observed compounds was the lowest in the case of extraction with pure water (knots <13 mg/g, heartwood <5 mg/g), higher in ethanolic extracts (knots <33 mg/g, heartwood <10 mg/g) and the highest when extracted with acetone (knots <35 mg/g, heartwood <10 mg/g). The ratio between PS and PSMME in water extracts is 1:1,5 and 1:3 when extracted with ethanol or acetone. The counter-current extraction is a suitable method for acquiring pinosylvin from pine wood.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED LITERATURE	2
2.1 POVZETEK EKOLOGIJE IN BIOGRAFIJE RODU PINUS.....	2
2.2 BELJAVA IN JEDROVINA.....	4
2.2.1 Kemijske spremembe v procesu ojedritve	6
2.2.2 Strukturne spremembe, ki spremljajo ojedritev	6
2.3 O GRČAH	7
2.3.1 Fizikalne in kemijske značilnosti grč.....	8
2.4 EKSTRAKTIVI.....	9
2.4.1 Ekstraktivne spojine v lesu.....	9
2.4.2 Ekstraktivi v lesu rdečega bora.....	10
2.4.3 Stilbeni.....	12
2.4.4 Pinosilvini.....	12
2.5 EKSTRAKCIJSKE METODE	13
2.5.1 Ekstrakcijska metoda po Soxhlet-u	13
2.5.2 Protitočna ekstrakcija.....	15
2.6 KROMATOGRAFSKE ANALIZE	16

2.6.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	19
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 IZBOR MATERIALA	21
3.2 PRIPRAVA VZORCA.....	23
3.3 UPORABLJENI REAGENTI IN TOPILA.....	25
3.4 METODE	26
3.4.1 Določanje deleža suhe snovi	26
3.4.2 Protitočna ekstrakcija.....	26
3.4.2.1 Preliminarni poskus - osemfazna protitočna ekstrakcija z vodo	26
3.4.2.2 Petfazna protitočna ekstrakcija.....	28
3.4.3 Suhi ostanek ekstrakta.....	29
3.4.4 UV-VIS absorpcijska spektroskopija	30
3.4.5 HPLC analiza lesnih ekstraktov bora	32
4 REZULTATI.....	35
4.1 VSEBNOST SUHE SNOVI.....	35
4.2 EKSTRAKCIJSKI IZKORISTKI OSEMFAZNE PROTITOČNE EKSTRAKCIJE Z VODO	35
4.2.1 Količina ekstrahiranih snovi	35
4.2.2 Količina ekstrahiranih celokupnih fenolov.....	36
4.2.3 Količina ekstrahiranega pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra..	37
4.3 IZKORISTEK PETFAZNE PROTITOČNE EKSTRAKCIJE Z UPORABO RAZLIČNIH TOPIL	38
4.3.1 Ekstrakcijska učinkovitost petfazne protitočne ekstrakcije z vodo	41
4.3.2 Ekstrakcijska učinkovitost petfazne protitočne ekstrakcije z vodno raztopino etanola	45

4.3.3 Ekstrakcijska učinkovitost petfazne protitočne ekstrakcije z vodno raztopino acetona	50
4.4 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI TOPIL V PETFAZNI PROTITOČNI EKSTRAKCIJI.....	54
5 SKLEPI	60
6 POVZETEK.....	61
7 VIRI	62
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Str.

Preglednica 1: Vsebnost pinosilvinov v posameznih tkivih debla rdečega bora (prirejeno po Willför in Hemming, 2003). 13

Preglednica 2: Delež suhe snovi v vzorcu žagovine grč in jedrovine rdečega bora..... 35

KAZALO SLIK

Str.

Slika 1: Razširjenost rdečega bora (Brus, 2008)	2
Slika 2: Razširjenost rdečega bora v Sloveniji (Zavod za gozdove Slovenije, 2005)	3
Slika 3: Jedrovina in beljava (prirejeno po Micro-Forum, 2010).....	5
Slika 4: Nezrasla grča (levo) in zrasla grča (desno) pri rdečem boru (prirejeno po Woodworker, 2004).....	7
Slika 5: Nastajanje lesnega tkiva v grčah (Shigo, 1985)	8
Slika 6: Odlomljena veja predstavlja rano v deblu (Shigo, 1985).....	8
Slika 7: Ekstraktivi v lesu (Oven, 2013).....	10
Slika 8: Kemijska sestava beljave in jedrovine pri rdečem boru (Sjöström, 1993).....	11
Slika 9: Pinosilvini v rdečem boru.	13
Slika 10: Princip delovanja Soxhletove aparature (prirejeno po DMT, 2010).....	14
Slika 11: Soxhletova aparatura (prirejeno po Royal society of chemistry, 2007).....	15
Slika 12: Shema kontinuiranega protitočnega ekstraktorja (prirejeno po Gea Finland, 2014).....	16
Slika 13: Mihael Cvet (Mikhail Semyonovich Tsvet) (Žorž, 1991).	17
Slika 14: Čas potovanja molekul spojine skozi kolono se lahko spreminja in je odvisen predvsem od homogenosti polnjenja kolone in velikosti delcev stacionarne faze (Thermo Scientific, 2012).	18
Slika 15: Shematski prikaz HPLC sistema (Waters, 2014).....	20
Slika 16: Priprava kolutov iz debla (foto: Viljem Vek).	22
Slika 17: Določanje jedrovine in starosti kolutov (levo), vzorčenje (desno), (foto: Viljem Vek).	23
Slika 18: Mlin za mletje Retsch SM 2000.....	23
Slika 19: Sušenje vzorcev žagovine v prahovkah.	24
Slika 20: Zmes žagovine grč za industrijski vzorec.	25
Slika 21: Shema osemfazne protitočne ekstrakcije z vodo.....	27
Slika 22: Shema petfazne protitočne ekstrakcije.....	29
Slika 23: Vzorci vodnih ekstraktov po dodanem reagentu celokupnih fenolov.....	30
Slika 24: Thermo Fischer Scientific Accela HPLC modularni sistem (Vek, 2013).....	33

Slika 25: Kalibracijski premici za pinosilvin (zgoraj) in pinosilvin monometilni eter (spodaj). Območje linearnosti ($r^2 \geq 0,99$).....	34
Slika 26: Količina z vodo ekstrahiranih snovi iz vzorca jedrovine v sistemu osemfazne protitočne ekstrakcije. Vrednosti so podane v miligramih na gram absolutno suhega lesa.....	36
Slika 27: Količina iz jedrovine ekstrahiranih celokupnih fenolov v sistemu osemfazne protitočne ekstrakcije z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.	37
Slika 28: Količina iz jedrovine ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri osemfazni protitočni ekstrakciji z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.....	38
Slika 29: Shema petfazne protitočne ekstrakcije z enajstimi ponovitvami.	40
Slika 30: Interpretacija količin ekstrahiranih snovi v vzorcih pri sistemu petfazne protitočne ekstrakcije.	41
Slika 31: Količina ekstrahiranih snovi v petfazni protitočni ekstrakciji lesa jedrovine in grč z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.....	42
Slika 32: Količina celokupnih fenolov pri petfazni protitočni ekstrakciji z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.	42
Slika 33: Kromatogram vodnega ekstrakta grč rdečega bora (GA5-H ₂ O).	43
Slika 34: Strukturna formula lignana, nortrahelogenin (NTG).	43
Slika 35: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri petfazni protitočni ekstrakciji grč z vodo.	44
Slika 36: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri petfazni protitočni ekstrakciji jedrovine z vodo.	45
Slika 37: Količina ekstrahirane snovi v etanolnih ekstraktih (vol. 50 %) petfazne protitočne ekstrakcije. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa. 46	46
Slika 38: Količina ekstrahirane snovi v etanolnih ekstraktih (vol. 60 %) petfazne protitočne ekstrakcije. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa. 46	46
Slika 39: Koncentracija celokupnih fenolov v etanolnih ekstraktih (vol. 50 %) pri petfazni protitočni ekstrakciji. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.....	47

Slika 40: Koncentracija celokupnih fenolov v etanolnih ekstraktih (vol. 60 %) pri petfazni protitočni ekstrakciji. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.....	47
Slika 41: Kromatogram etanolni ekstrakta grč bora (GA5-ET60).	48
Slika 42: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih grč (vol. 50 %) petfazne protitočne ekstrakcije.	48
Slika 43: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih jedrovine (vol. 50 %) petfazne protitočne ekstrakcije.....	49
Slika 44: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih grč (vol. 60 %) petfazne protitočne ekstrakcije.	49
Slika 45: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih jedrovine (vol. 60 %) petfazne protitočne ekstrakcije.....	50
Slika 46: Količina ekstrahirane snovi v acetonskih ekstraktih (vol. 95 %) jedrovine in grč v sistemu petfazne protitočne ekstrakcije. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.....	51
Slika 47: Koncentracija celokupnih fenolov v acetonskih ekstraktih (vol. 95 %) pri petfazni protitočni ekstrakciji. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.....	51
Slika 48: Kromatogram acetonskega ekstrakta grč rdečega bora (GA5-AC95).	52
Slika 49: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri acetonskih ekstraktih grč (vol. 95 %) v sistemu petfazne protitočne ekstrakcije.....	52
Slika 50: Količina ekstrahiranega pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra pri acetonskih ekstraktih jedrovine (vol. 95 %) petfazne protitočne ekstrakcije.....	53
Slika 51: Primerjava ekstrahiranih snovi pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H_2O – dest. H_2O ; ET50, ET60 - etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/ H_2O (95/5 (v/v))).	55

Slika 52: Primerjava količin celokupnih fenolov pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H_2O – dest. H_2O ; ET50, ET60 - etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/ H_2O (95/5 (v/v))).	55
Slika 53: Primerjava količin pinosilvina (PS) pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H_2O – dest. H_2O ; ET50, ET60 - etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/ H_2O (95/5 (v/v))).	56
Slika 54: Primerjava količin pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H_2O – dest. H_2O ; ET50, ET60 - etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/ H_2O (95/5 (v/v))).	57
Slika 55: Primerjava razmerij pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) za grče in jedrovino s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H_2O – dest. H_2O ; ET50, ET60 - etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/ H_2O (95/5 (v/v))).	57
Slika 56: Zveza med vsebnostjo celokupnih fenolov in vsebnostjo stilbenov (PS+PSMME).	59

1 UVOD

Les je kemični proizvod rastlin. Poleg gradnikov celičnih sten vsebuje tudi spojine, ki jih je moč ekstrahirati. Posamezne ekstraktivne snovi se lahko pojavljajo pri večjem številu drevesnih vrst. Stilbeni so značilni za iglavce, nekatere pa so značilne samo za določene botanične rodove. Tako sta pinosilvin in pinosilvin monometilni eter značilna le za rod borov (*Pinus*). Najdemo jih predvsem v jedrovini, v večjih količinah pa v grčah. Rdeči bor (*Pinus sylvestris* L.) je pri nas najpogostejsa vrsta bora, v slovenskih gozdovih predstavlja kar 4,9 % skupne lesne mase. Znano je, da so stilbeni biološko aktivne spojine, ki bi utegnile biti uporabne za različne namene.

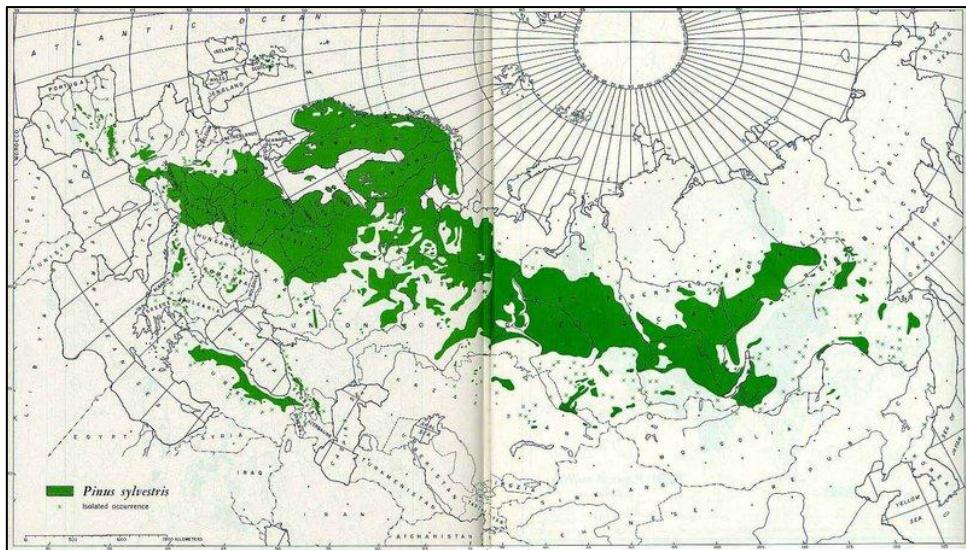
Za ekstrakcijo pinosilvina se najpogosteje uporabljam različna polarna topila. Fang in sod. (2013) so prišli do ugotovitev, da z vročo vodo in vodno etanolnimi ekstrakti iz lesa bora pridobimo primerne snovi za prehranske izdelke. V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti ali je protitočna ekstrakcija primerna za izločanje pinosilvinov iz lesa rdečega bora. Preliminarni poskus smo izvedli za optimizacijo poteka ekstrakcije, parametrov in količin surovine ter topil. V nadaljevanju naloge smo v optimalnem petfaznem protitočnem sistemu preučevali učinkovitost različnih topil za ekstrahiranje pinosilvina. Uporabili smo tri različne sisteme topil; destilirano vodo, različni koncentraciji etanola in vodno raztopino acetona. Vse rezultate smo ovrednotili gravimetrično, spektrofotometrično in kromatografsko.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 POVZETEK EKOLOGIJE IN BIOGRAFIJE RODU PINUS

Bor je iglasto drevo iz rodu borovcev (*Pinus*) v družini borovk (*Pinaceae*). Je verjetno najpogosteji rod iglavcev na Zemlji, saj je znanih več kot sto vrst. Vse so razširjene na severni polobli, mnoge med njimi so gospodarsko zelo pomembne (Brus, 2008).

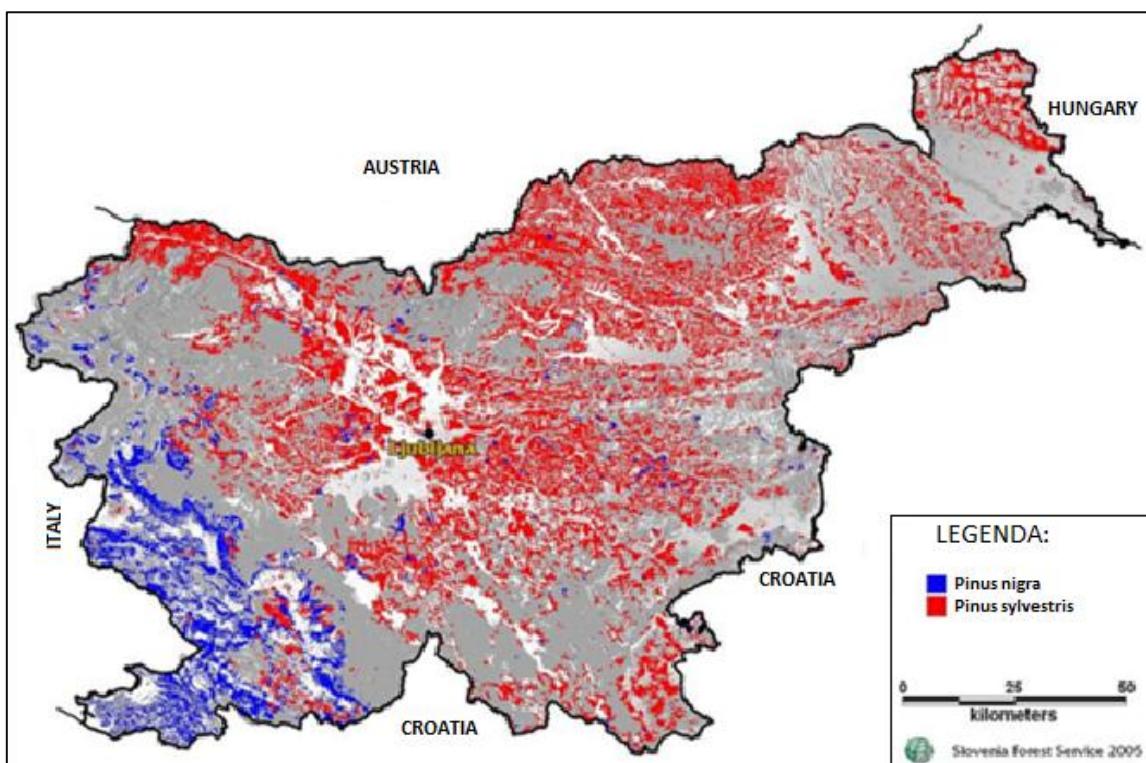
Rdeči bor (*Pinus sylvestris* L.) je do 30 metrov visoko, do 1 meter debelo vedno zeleno iglasto drevo. Je skromna in zelo prilagodljiva vrsta, uspešno raste na skoraj vseh vrstah tal. Rdeči bor ima enega največjih arealov med drevesnimi vrstami, med bori celo največjega. Raste v severni in srednji Evropi, na Škotskem, v Pirenejih, francoskem Centralnem masivu, Karpatih in na balkanskih gorovjih (Slika 1).



Slika 1: Razširjenost rdečega bora (Brus, 2008).

Njegova današnja razraščenost je v veliki meri umetna oziroma je posledica sejanja ali premočnega siromašenja rastišč v preteklosti. Rdeči bor (*Pinus sylvestris* L.) je odporen iglavec, ki prenaša ekstremne razmere. Veter, sonce in suša mu skoraj ne pridejo do živega. Je nezahteven in sodi med pionirske vrste – vrste, ki se pojavljajo na uničenih, poškodovanih in degradiranih območjih.

V Sloveniji ga najdemo povsod. Največ ga je na rečnih naplavinah ob Savi in Dravi in v ljubljanski kotlini (Slika 2). Ustrezajo mu predvsem kisla tla, uspeva pa tudi na suhih bazičnih tleh. Je najpogostejša vrsta bora in je leta 2000 predstavljal 4,9 % skupne lesne zaloge v Sloveniji. Je najbolj razširjen iglavec in gozdarsko zelo pomembna vrsta. Zaradi manjšega volumskega prirastka in nekonkurenčnosti na najboljših rastiščih po gospodarskem pomenu ne dosega smreke.



Slika 2: Razširjenost rdečega bora v Sloveniji (Zavod za gozdove Slovenije, 2005).

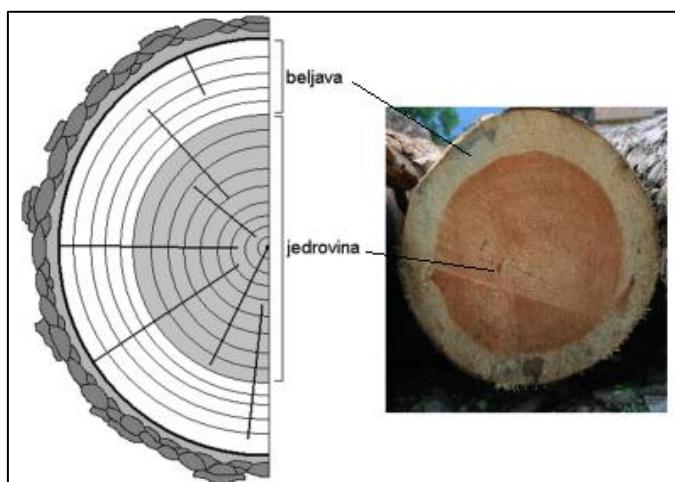
Les je uporaben v mizarstvu, gradbeništvu, pri vodogradnjah, za izdelavo stavbnega pohištva, ladijskih podov, v preteklosti se je uporabljal kot rudniški les, za tramove in zaboje. Poleg lesa so predvsem v zdravilstvu uporabni tudi drugi rastlinski deli. Iglice vsebujejo veliko vitamina C, čaj iz storžkov čisti kri, vdihovanje sopare pomaga pri vnetju pljuč in žrela, sopara brstov pa učinkovito čisti zamašen nos. Rdeči bor je primeren tudi za smolarjenje, njegova skorja se uporablja pri čiščenju onesnaženj z nafto (Brus, 2008).

2.2 BELJAVA IN JEDROVINA

Beljavo sestavlja lesno tkivo perifernih delov debla in vej s še živimi parenhimskimi celicami, ki vsebujejo rezervne snovi (Torelli, 1990). Lesno tkivo je sestavljeno predvsem iz mrtvih celic, ki po končani rasti in razvoju v kambiju odmrejo in opravljajo prevajalno in vezivno vlogo. Parenhim predstavlja žive celice v beljavi, ki vsebujejo zaloge škroba. Spremembe v beljavi se začnejo z odmiranjem parenhimskih celic. Pri določenih drevesnih vrstah parenhimske celice odmrejo v tako imenovani prehodni coni, kjer nastaja jedrovina (Bamber, 1961).

Jedrovina predstavlja notranje plasti lesa v rastočem drevesu, kjer so parenhimske celice odmrle, rezervne snovi, ki so jih le-te vsebovale, npr. škrob pa so se odstranile ali spremenile v jedrovinske snovi. Pri nas so jedrovine večinoma obarvane in tedaj jih lahko imenujemo črnjava. Jedrovina je lahko tudi neobarvana, kot pri smreki in jelki. Barvno razlikovanje beljave in jedrovine tako ni vedno mogoče (Torelli, 1990). Popolno odmrtje parenhimskih celic pomeni zaključek procesa nastanka jedrovine (Taylor in sod., 2002).

Borovina spada med iglavce z obarvano jedrovino, ki je rjavkaste do rdečerjave barve in široko beljavo, rumenkasto do rdečkasto-bele barve. Ima razločne branike in številne smolne kanale. Srednja gostota lesa je 490 kg/m^3 (Čufar, 2006). Jedrovina pri rdečem boru nastaja v ozkem območju na notranjem robu beljave, v tako imenovani prehodni coni, širine do eno braniko (Bergström, 2003).



Slika 3: Jedrovina in beljava (prirejeno po Micro-Forum, 2010).

Mejo med beljavo in jedrovino po navadi določamo vizualno (Slika 3), saj je jedrovina temnejša zaradi večje vsebnosti ekstraktivov. Včasih vizualno določanje ni dovolj natančno, zato se poslužujemo različnih tehnik, ki temeljijo na razlikah med beljavo in jedrovino, kot so prisotnost škroba, permeabilnost, vlažnost ter vsebnost jedrovinskih snovi. Najbolj priljubljena in priročna je metoda določanja prisotnosti škroba z jodovico. Druga pogosto uporabljeni metoda pa temelji na meritvah lesne vlažnosti, saj imata jedrovina in prehodna cona nižjo vlažnost kot beljava. Meje prehodne cone je težko določiti in so odvisne od metode, ki jo uporabljamo (Bergström, 2003).

Kemijske in strukturne razlike med beljavo in jedrovino so dobro poznane pri različnih drevesnih vrstah. Beljava je najbolj aktivni del debla, njena glavna funkcija je prevajanje vode od korenin do listov. Nastajanje jedrovine iz beljave je kemijski in fiziološki mehanizem zaščite drevesa, kar je zelo pomembno za obstojnost dreves in trajnost lesa. Poznamo več mehanizmov nastajanja jedrovine. Nastajanje jedrovine je verjetno posledica staranja in odmiranja parenhimskih celic, kot posledica naključnega dogajanja med odmrlim delom in beljavo. Kemijske spremembe so opazne ob umiku vode iz celic notranjega dela beljave. Študije potrjujejo, da je to glavni razlog za začetek nastajanja jedrovine, ampak vzrok umika vode je še vedno neznan. Poznamo več tipov nastajanja jedrovine. Skupna lastnost drevesnih rodov s tako imenovano pravo jedrovino (*Robinia*, *Quercus*, *Pinus*, *Eucalyptus*, *Cryptomeria*) je prehodna cona (Bergström, 2003).

V prehodni coni se beljava pretvarja v jedrovino in jo lahko opišemo kot ozko slabo obarvano cono okoli jedrovine. Po navadi vsebuje še živeče parenhimske celice brez škroba. Vsebnost vode v prehodni coni je načeloma nižja kot v beljavi, včasih tudi nižja kot v jedrovini (Hillis, 1887).

2.2.1 Kemijske spremembe v procesu ojedritve

Nastajanje jedrovine spremljajo kemijske spremembe v prehodni coni, kjer se poviša vsebnost polifenolov. Poviša se vsebnost toksičnih komponent v jedrovini, ki so najpomembnejši faktor večje naravne odpornosti od beljave. Če naravno odpornemu lesu odvzamemo ekstraktive, postane dovzetnejši za škodljivce (Smith in sod., 1989). Pri nastajanju jedrovine se obarvane snovi začnejo kopiti v odmirajočih parenhimskih celicah in difundirajo v okoliška tkiva, kar povzroči spremembo barve lesa v jedrovini (Bamber, 1961).

Čeprav je kemijska sestava beljave in jedrovine dobro poznana je malo informacij o kemijskih spremembah v prehodni coni. Najpomembnejša sprememba pri nastajanju jedrovine v rodu *Pinus* je poraba skladiščenega škroba v trakovnih parenhimskih celicah, znižanje vlažnosti, odmiranje ter lignifikacija parenhimskih celic in odlaganje ekstraktivov (Bergström, 2003).

2.2.2 Strukturne spremembe, ki spremljajo ojedritev

Strukturne spremembe v lesu so pogosto posledica kemijskih sprememb. Trakovne parenhimske celice začnejo odmirati na meji prehodne cone z beljavo in odmrejo do začetka jedrovine. V odmrlih parenhimskih celicah ni več škrobnih zrn. Nenadno spremembo vsebnosti ekstraktivov lahko pripisemo mrtvim parenhimskim celicam, katere verjetno začnejo odmirati zaradi toksičnih spojin v prehodni coni. Lignifikacija, kar je značilna lastnost odmirajočih celic, je povezana z odmiranjem parenhimskih celic (Bergström, 2003). Pri listavcih se v lumnih trahej razvijajo mehurčkaste tvorbe, tako imenovane tile, ki so izrastki parenhima, taninskih ali gumoznih snovi. Pri iglavcih pa

neprevodnost traheid povzroči zaprtje pikenskih odprtin (aspiracija) ali pa povišano odlaganje smol in taninov (Bamber, 1961).

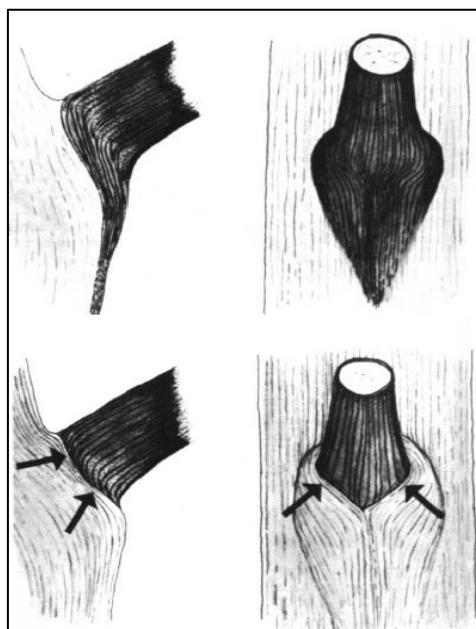
2.3 O GRČAH

Grča predstavlja tisti del veje, ki je ostal vključen v deblo drevesa. Čeprav so grče posledica naravnega razvoja drevesa jih zaradi njihovega negativnega vpliva na lastnosti lesa štejemo za napake. Prisotnost grč v drevesu vpliva na mehansko trdnost lesa, zaradi nehomogenosti in spremembe smeri lesnih vlaken (Torelli, 1990).



Slika 4: Nezrasla grča (levo) in zrasla grča (desno) pri rdečem boru (prirejeno po Woodworker, 2004).

Organiziranost in struktura tkiv v veji sta podobni tkivom v deblu. Rdeče sledi, ki jih pusti veja v deblu, medtem, ko ta še raste imenujemo zrasle grče (Slika 4). Tkiva so med seboj povezana s kambijem (Slika 5), ko pa veja odmre, kambij v veji preneha z delovanjem in jo začne obraščati živo tkivo debla. Od tega trenutka naprej je v tkivu med deblom in grčo presledek, tako nastalo »napako« imenujemo nezrasla ali izpadna grča (Slika 4). Grče se razlikujejo po velikosti, obliki in izvoru. (Green in sod., 1999).



Slika 5: Nastajanje lesnega tkiva v grčah (Shigo, 1985).

2.3.1 Fizikalne in kemijske značilnosti grč

Kjer se veja odlomi blizu debla, na njem nastane odprta rana, ki naredi grčo dovzetno za zunanje napade gliv in drugih mikroorganizmov (Slika 6). Drevo je na to pripravljeno strukturno in kemijsko z bioaktivnimi spojinami, zato se fizikalne in kemijske lastnosti grč razlikujejo od lesa v deblu (Shigo, 1985).



Slika 6: Odlomljena veja predstavlja rano v deblu (Shigo, 1985).

Ekstrakte grč in lesa primerjamo, da bi ugotovili, ali so grče obetaven material za pridobivanje dragocenih spojin. Nedavne študije kažejo, da je za nekaj vrst iglavcev (jelka, smreka, bor) in nekatere vrste listavcev (topol, vrba, akacija) značilna visoka vsebnost polifenolov. Iglavci večinoma vsebujejo lignane, oligolignane in stilbene, medtem ko pri listavcih prevladujejo flavonoidi. V primerjavi z preostalimi deli debla, je vsebnost polifenolov v grčah višja (Yang in Jaakkola, 2012).

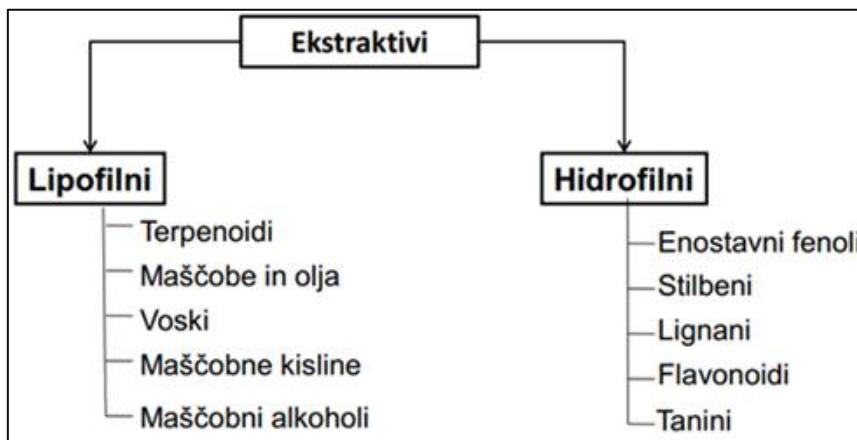
2.4 EKSTRAKTIVI

2.4.1 Ekstraktivne spojine v lesu

Les vsebuje široko paleto spojin z nizko in srednjo molekulsko maso, katere lahko izločimo z ekstrakcijo v primernem topilu. Večina ekstraktivov v lesu je produkt metabolnih procesov. Poleg celične rasti in njenega razvoja, nekatere spojine sodelujejo pri zaščiti drevesa pred boleznimi in tujimi organizmi. Kasneje pa je njihova prisotnost odgovorna za naravno odpornost lesa (Tišler in Lipušček, 2001).

Ekstraktivni predstavljajo veliko število nestrukturnih spojin v drevesu, ki jih lahko iz tkiv izločimo s polarnimi ali nepolarnimi topili. Tako ekstraktivni vplivajo na vonj in barvo lesa, higroskopnost in stabilnost lesa, gostoto, trdoto in odpornost proti glivam in insektom (Oven, 2013).

Ločimo lipofilne in hidrofilne ekstraktive (Slika 7). Količina in vrsta ekstraktivov v lesu sta odvisni od lesne vrste, geografskega položaja, letnega časa, mesta odvzema vzorca (deblo, veje, korenine) in ekoloških vplivov (Oven, 2013).



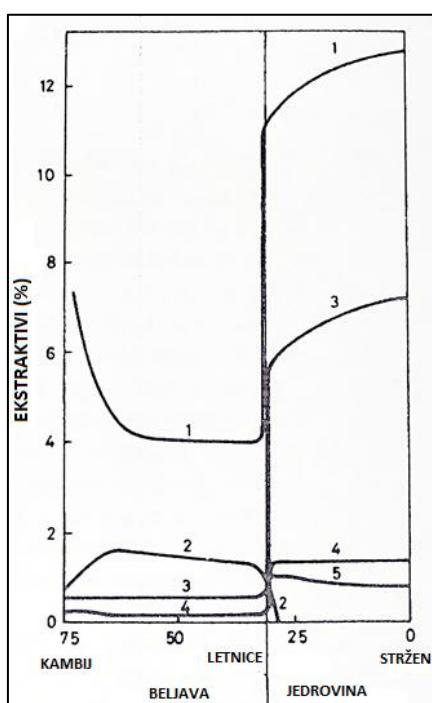
Slika 7: Ekstraktivi v lesu (Oven, 2013).

Pri živih drevesih so te spojine prisotne predvsem v notranjem delu debla, ki ne sodeluje več pri distribuciji vode in ima zgolj še konstrukcijsko vlogo. Sinteza in skladiščenje zaščitnih spojin potekata v parenhimskem tkivu, večinoma v trakovnih parenhimskih celicah med nastajanjem jedrovine. Veliko teh spojin je obarvanih in dajejo drugačno, včasih prepoznavno barvo jedrovine (Pereira in sod., 2003).

Zanimivo skupino ekstraktivov predstavljajo fenolne skupine, kot so lignani, flavonoidi, tanini in stilbeni. Te spojine izkazujejo biološko aktivnost. Imajo fungicidne, antibiotične in antioksidantne lastnosti, zato so primerna za uporabo v prehranski verigi, kot prehranska dopolnila ali celo zdravila (Oven, 2013).

2.4.2 Ekstraktivi v lesu rdečega bora

Široka paleta različnih spojin v lesu je topnih v vodi ali organskih topilih, zato jih imenujemo ekstraktivi. Praviloma različni deli istega drevesa (deblo, veje, korenine, skorja, iglice ali listi) vsebujejo različne spojine in koncentracije le teh. Tako variira tudi porazdeljenost in koncentracija spojin pri rdečem boru od stržena navzven (Slika 8).



Slika 8: Kemijska sestava beljave in jedrovine pri rdečem boru (Sjöström, 1993).

Največje razlike pri vsebnosti ekstraktivnih snovi se pojavijo na prehodu iz beljave v jedrovino, kjer je vsebnost ekstraktivov na splošno (1) dvakrat višja (Slika 8). Prisotnost smolnih kislin (3) se v jedrovini občutno poviša (do desetkrat), kot tudi maščobnih kislin (4), medtem ko trigliceridov (2) v jedrovini skoraj da ni več, pa se na drugi strani pojavita pinosilvin in pinosilvin monometilni eter (5).

Analize fenolnih in lipofilnih ekstraktov grč rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) so pokazale visoko vsebnost stilbenov (1 % - 7 %) in lignanov (0,4 % - 3 %), medtem, ko samo deblo vsebuje do 1 % stilbenov in skoraj ni sledi o lignanih. V grčah najbolj prisoten lignan je nortrahelogenin, v manjših količinah pa metairesinol, secoisolariciresinol in liovil. Vsebnost stilbenov v grčah je lahko do dvestokrat višja od vsebnosti v deblu. Zaznati je mogoče razliko vsebnosti fenolnih spojin med grčami. Razmerje pinosilvina in pinosilvin monometil etra je v grčah višje kot v deblu. Grče prav tako vsebujejo veliko drugih lignanu podobnih komponent. Flavonoid pinocembrin se pojavlja v lesu grč in debla z vsebnostjo pod 0,02 %. Koncentracija stilbenov v radialni smeri počasi narašča od stržena navzven. Na bazi veje (grča) se opazno poviša, v sami veji pa je vsebnost stilbenov zanemarljiva.

Grče vsebujejo veliko (4,5 % - 32 %) lipofilnih ekstraktov in do 0,5 % diterpenil aldehydov (Willför in Hemming, 2003).

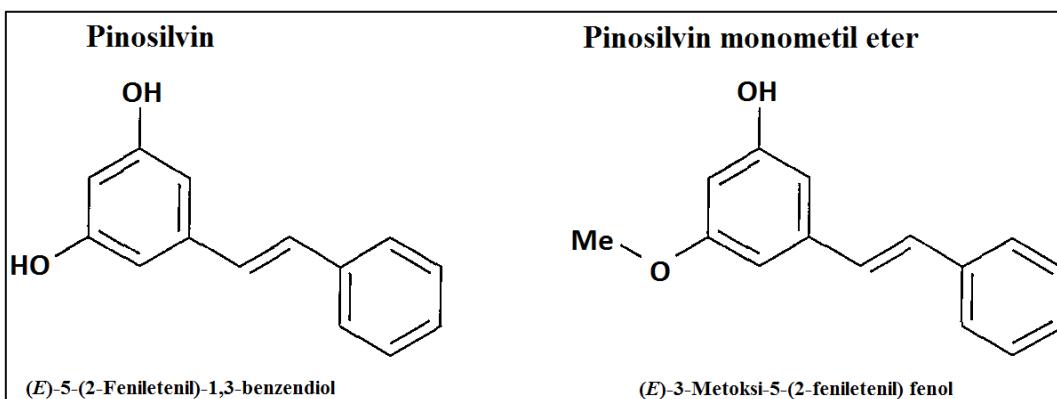
2.4.3 Stilbeni

Stilbeni so zastopani predvsem v jedrovini borov in so vrsta ekstraktivov, za katere so dokazali, da zavirajo rast gliv in meddrugim nastajajo kot odziv na napad insektov (Gorham, 1995). Prisotnost stilbenov predstavlja problem pri nekaterih rabah lesa. Pripisujejo jim temnjenje lesa izpostavljenega svetlobi in težave pri izdelavi lesne kaše za papir (Pereira in sod., 2003).

V lesu borov so stilbenski derivati (Slika 9), za katere je značilno, da fluorescirajo modro v ultravijolični svetlobi. Uporabljam se tudi kot optični belilci v pralnih sredstvih, ker dajejo v beli svetlobi vtip posebne beline. V stiku s kožo občutljivih ljudi povzročajo alergije in draženje kože. V lesovih se nahajajo naslednji stilbeni: 4-hidroksistilben, 4-metoksistilben, pinosilvin, pinosilvin monometil eter, pinosilvin dimetil eter, piceid (Tišler in Lipušček, 2001).

2.4.4 Pinosilvini

Pinosilvini (Slika 9) so zastopani predvsem v jedrovini in grčah borov, kjer višajo naravno trajnost lesa. Ima fungocidne, antibakterijske in antimaligne učinke. Vsebnost pinosilvina variira med drevesi, še bolj pa med drevesnimi vrstami (Willför in Hemming, 2003).



Slika 9: Pinosilvini v rdečem boru.

Preglednica 1: Vsebnost pinosilvinov v posameznih tkivih debla rdečega bora (prirejeno po Willför in Hemming, 2003).

	PS (mg/g)	PSMME (mg/g)	PSDME (mg/g)	OSTALI STILBENI
BELJAVA	0,11 – 0,14	<0,05	<0,05	<0,05
JEDROVINA	3,7 – 5,5	5,1 – 6,3	<0,14	0,15 – 0,27
GRČE	4,5 – 19	13 – 49	0,09 – 0,89	0,14 – 2,6

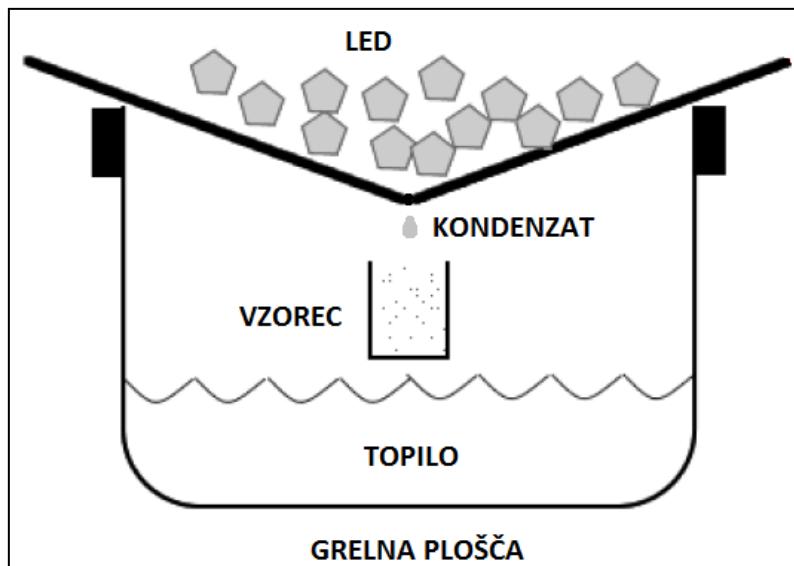
2.5 EKSTRAKCIJSKE METODE

Ekstrakcija ali izluževanje je kemijska metoda, ki omogoča prenos molekul želene snovi iz trdne zmesi ali raztopine v drugo tekočo fazo s pomočjo topila. Poznamo več načinov ekstrahiranja snovi, ki so se uveljavili kot različne metode. Najenostavnejša in najpogostejša ekstrakcijska tehnika je obdelava trdega vzorca s topilom, v katerem se iskana komponenta razaplja. Tako pridobljeni produkti iz lesa so relativno ne čiste tekočine ali prah, ki vsebujejo mešanico vseh snovi, ki se razapljujo v uporabljenem topilu (Handa, 2008).

2.5.1 Ekstrakcijska metoda po Soxhlet-u

Metoda je prvič opisana v letu 1879, kot vsestransko uporabna aparatura. Primerna je za ločevanje majhnih in velikih količin vzorca, s skoraj sto odstotno obnovljivostjo topila. Osnovni princip aparature temelji na nenehnem vračanju topila, ki kot para izhaja iz bučke

in se kot kondenzat vrača v obliki svežega topila na ekstrahiran vzorec (Slika 10). Vzorec je v celuloznem tulcu v ekstraktorju, kjer se kondenzat topila kopiči, dokler se nivo topila ne poviša do najvišje točke v sifonu in s tem povzroči refluks topila, takrat topilo z ekstraktom odteče v bučko (Jensen, 2007).



Slika 10: Princip delovanja Soxhletove aparature (prirejeno po DMT, 2010).

Soxhletovo aparatujo sestavlja trije glavni deli: kondenzator, ekstraktor s celuloznim tulcem in bučka s topilom (Slika 11):

- **Kondenzator**

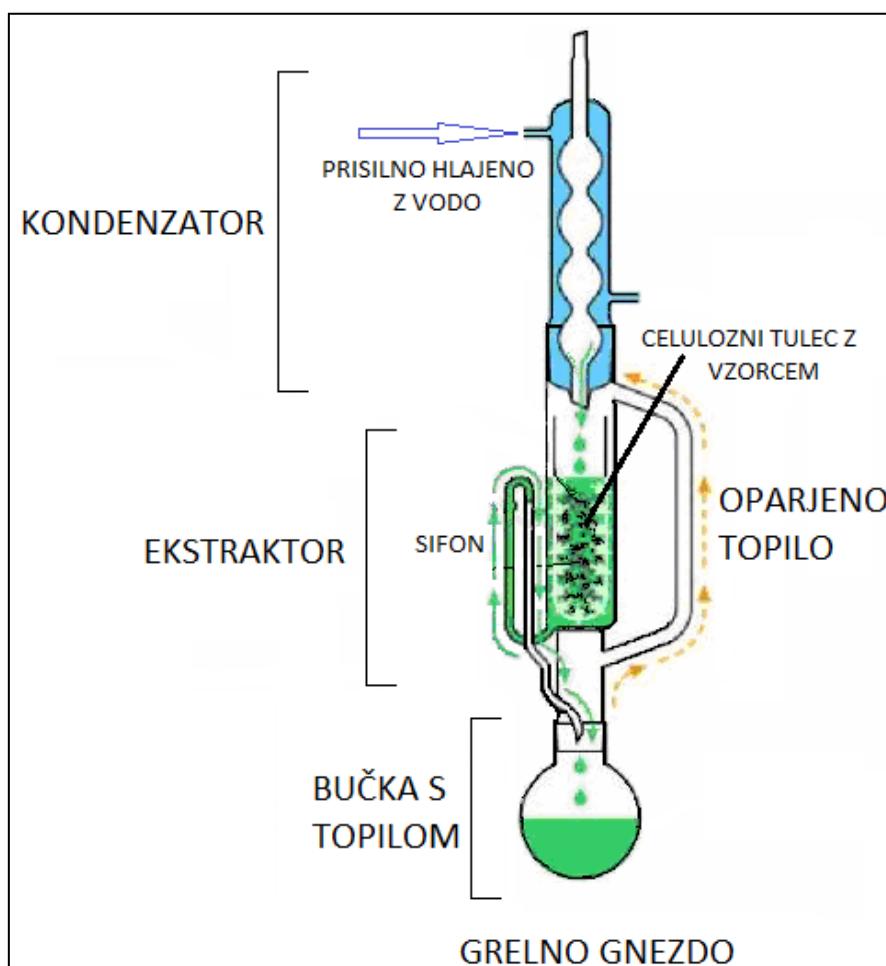
Je prisilno hljen in služi za ohlajanje oparjenega topila, ki na njem kondenzira in se vrača kot tekoče topilo v ekstraktor.

- **Ekstraktor s celuloznim tulcem**

Celulozni tulec v njem služi kot skladišče vzorca, skozi katerega prehaja kondenzirano topilo, ki s seboj odnaša v njem topne ekstraktive. Tako celulozni tulec služi kot filter, ki ločuje topne snovi od netopnih.

- **Bučka s topilom**

Iz nje izhajajo pare topila, hkrati pa služi kot rezervoar koncentriranega ekstrakta.



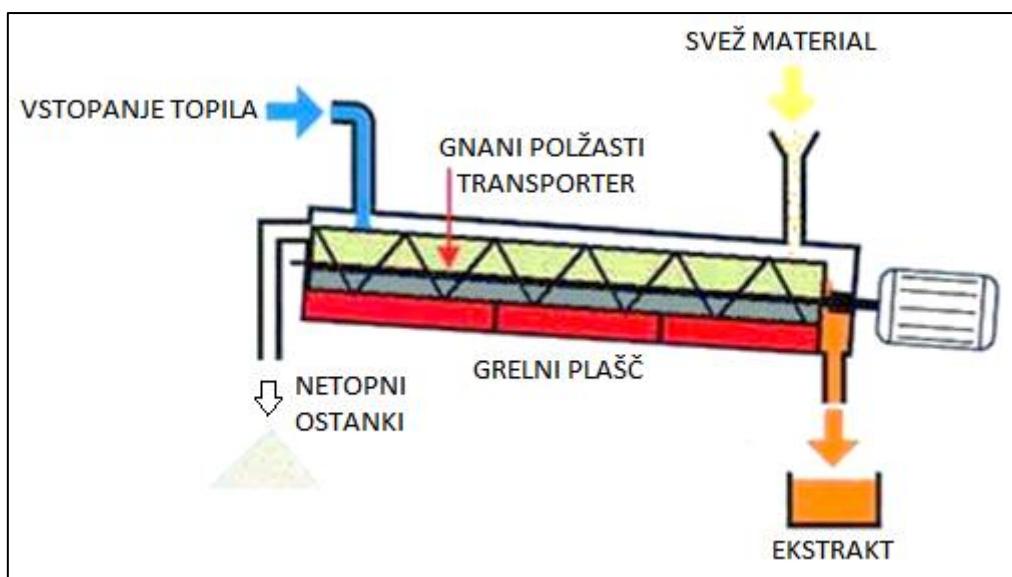
Slika 11: Soxhletova aparatura (prirejeno po Royal society of chemistry, 2007).

Glavne prednosti tega sistema so v tem, da se lahko z malo topila, iz vzorca izloči veliko snovi. Vračanje in s tem ponovna uporaba topila prinaša časovno, energijsko in finančno korist. V laboratorijskem obsegu se Soxhletova aparatura uporablja kot saržni postopek, vendar postane še bolj uporaben in ekonomičen, če ga vključimo v kontinuirano proceduro v srednjem ali večjem merilu (Handa, 2008).

2.5.2 Protitočna ekstrakcija

V protitočnem načinu ekstrakcije se surova, dobro zmleta surovina kot fina gošča s polžastim transporterjem pomika po ekstraktoru, kjer pride v stik s topilom, ki pa potuje v nasprotni smeri (Slika 12). Dlje kot potujeta drug proti drugemu, večjo koncentracijo

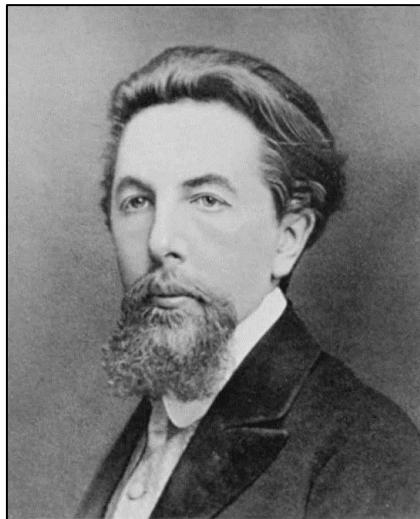
raztopljenih snovi dosežemo v ekstraktu; tako na eni strani izhaja visoko koncentriran ekstrakt, medtem ko na drugi strani izhaja brozga, ki predstavlja netopno fazo v uporabljenem topilu. Za čim bolj uspešno ekstrakcijo, je potrebno uskladiti količine topila in surovine ter optimizirati njune pretoke. Ta metoda beleži dobre izkoristke topila, kratek čas ekstrakcije in ne potrebuje povišanih temperatur (Handa, 2008).



Slika 12: Shema kontinuiranega protitočnega ekstraktorja (prirejeno po Gea Finland, 2014).

2.6 KROMATOGRAFSKE ANALIZE

Kromatografija predstavlja skupno ime fizikalno kemijskih metod ločevanja komponent iz zmesi oziroma raztopin, omogoča nam kvalitativno in kvantitativno vrednotenje posameznih spojin. Beseda kromatografija izvira iz grščine (*Chromos* - barva, *Grafein* – pisati). Za odkritje kromatografije štejemo leto 1906, ko je ruski botanik Mihael Cvet (Slika 13) stekleno kolono napolnil s kalcijevim karbonatom (kreda), nanjo nanesel rastlinske pigmente iz listov (klorofil) in jih z izpiranjem s petrolejem ločil v karotene in ksantofile (Žorž, 1991).

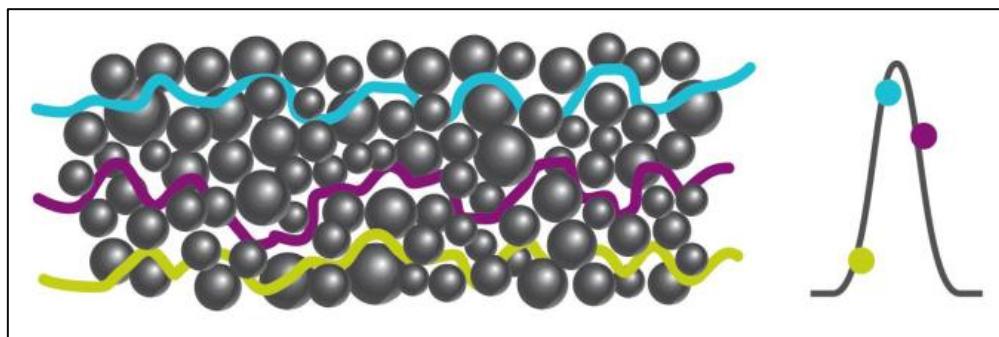


Slika 13: Mihael Cvet (Mikhail Semyonovich Tsvet) (Žorž, 1991).

Omenjena kromatografska ločba, ki jo je izvedel Mihael Cvet, je bila dejansko metoda kolonske tekočinske kromatografije. Mihaela Cveta danes poznamo kot pionirja kromatografije, kar dokazuje tudi napis na njegovem nagrobniku, t.j. »Izumil je kromatografijo. Ločeval je molekule, a združeval ljudi«. Šele leta 1938 sta Izmailov in Shraiber opisala uporabo papirne (PC) in tankoplastne tekočinske kromatografije (TLC), ki jo je kasneje razvil Stahl. Martin in Synge sta z delom o tekočinski porazdelitveni kromatografiji položila teoretske temelje tekočinski kromatografiji in dala osnovo za razvoj papirne in plinske kromatografije. Za to delo sta leta 1952 prejela Nobelovo nagrado. Glede na naravo interakcije med topljencem in obema fazama sta kromatografskim metodam najbližji separacijski metodi ekstrakcija tekoče - tekoče in destilacija (Žorž, 1991).

Kromatografsko ločbo opisujejo različne hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (tekočina), pri čemer so različne hitrosti potovanja spojin skozi kolono posledica selektivnega zadrževanja (retencija) komponent na stacionarni fazi. Vzrok za krajše oziroma daljše zadrževanje spojin na koloni je posledica porazdelitve molekul med stacionarno in mobilno fazo glede na polarnost. To velja za neionizirane molekule, v primeru analize ioniziranih spojin pa je potrebno uporabiti ustrezne pufre. Na uspešnost kromatografske ločbe vplivajo številni fizikalni in kemijski faktorji. Širjenje vrhov ločenih spojin je tako posledica različno dolgih poti molekul (Slika 14) skozi

kolono, efekta prenosa mase oziroma radialne in longitudinalne difuzije molekul, posedanja stacionarne faze zaradi nepravilnosti kolone, seveda pa vpliv na kvaliteto ločbe pripisujemo tudi samemu sistemu. Tako na širjenje vrhov vpliva tudi mrtvi volumen, torej prostor, v katerem potuje molekula, pri čemer to ni stacionarna faza (Snyder in sod., 2010, Waksmundzka-Hajnos in Sherma, 2010).



Slika 14: Čas potovanja molekul spojine skozi kolono se lahko spreminja in je odvisen predvsem od homogenosti polnjenja kolone in velikosti delcev stacionarne faze (Thermo Scientific, 2012).

Kemijsko ločbo na koloni najbolje opišemo z retencijskim časom komponente (t_r) oziroma kapacitivnim faktorjem (k') molekule, ki ga opisuje enačba 1. Ta pravi, da bolj kot se molekula spojine prime na kolono (daljši kot je t_r molekule) v primerjavi s tisto komponento, ki se nič ne zadržuje, večji bo kapacitivni faktor za spojino. Večja, kot bo razlika med kapacitivnima faktorjema dveh različnih spojin, boljša bo ločba med njima. Kapacitivni faktor dejansko odraža število aktivnih mest v koloni in nam pokaže, kje se izloči vrh komponente v primerjavi s komponento, ki se nič ne zadržuje na koloni.

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \dots(1)$$

k' - kapacitivni faktor

t_r - retencijski čas komponente oziroma molekule

t_0 - retencijski čas komponente, ki se nič ne zadržuje na koloni

Kromatografske metode lahko glede na vrsto stacionarne oziroma mobilne faze v grobem delimo na plinsko in tekočinsko kromatografijo. Tekočinsko kromatografijo glede na vrsto stacionarne faze lahko nadalje delimo na normalno fazno (NP), ionsko (IC), gelsko (GPC, SEC) in reverzno fazno kromatografijo (RP). Za kvantitativno in kvalitativno vrednotenje nizko-molekularnih fitokemikalij se danes najpogosteje uporablja reverzna kromatografija, kjer je polarnost stacionarne faze manjša kot polarnost mobilne faze. Nepolarnost silikagela se doseže tako, da vodik prostih silanolnih skupin (Si-OH) substituiramo z različno dolgimi verigami oziroma skupinami (C₄, C₈, NH₂, CN, ipd). Pri tem hidroksilne skupine silikagela reagirajo s silanom, ki vsebuje dobro izstopajočo skupino, kot je kloridni ion. Kot mobilna faza se pri reverzni kromatografiji uporablja mešanica vode (ali pufra) in organskega topila (npr. metanol ali acetonitril) (Celimene in sod., 1999).

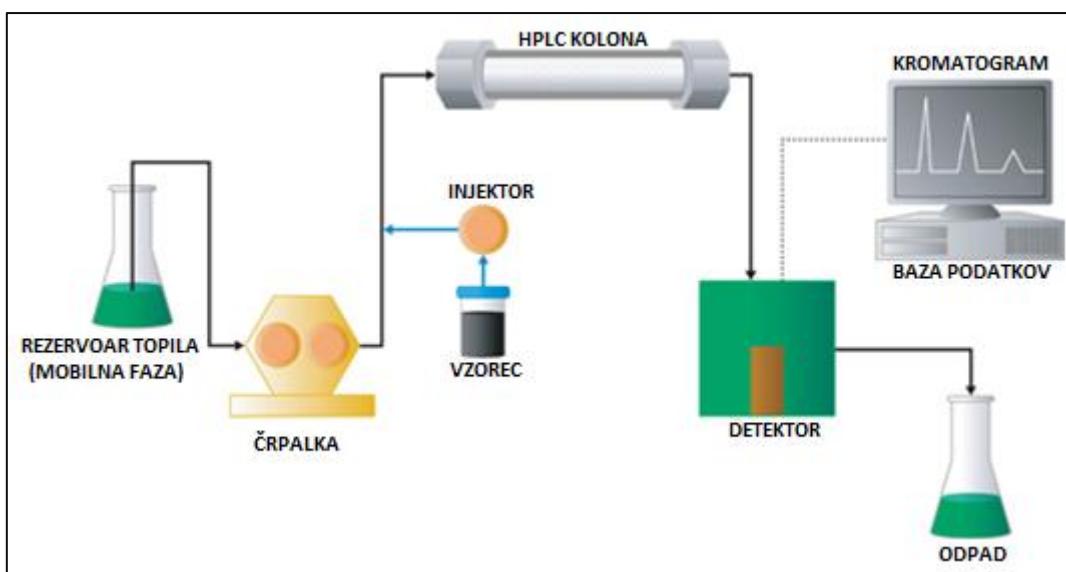
2.6.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Sistemi za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti so lahko v integrirani ali pa modularni obliki, pri čemer so slednji sestavljeni iz več posameznih modulov. V praksi se za analitske HPLC raziskave najpogosteje uporablajo modularni sistemi, ki jih tvorijo črpalka, avtomatski vzorčevalnik s kolono ter detektor. Integrirani sistemi pa so uporabni za kvantitativne HPLC kontrole, pri čemer na splošno velja, da so sistemi kot taki bolj stabilni, torej je pojav tehničnih težav redkejši.

Princip delovanja HPLC sistema prikazuje Slika 15. Črpalka potiska mobilno fazo, pri čemer se topila zamešajo v injektor. Preko injektorja v mobilno fazo prenesemo vzorec, kateri nato potuje na kolono, kjer se komponente vzorca ločijo. Te komponente potem različno časa potujejo čez pretočno celico detektorja, kar nam mogoča, da zaznamo vrhove za posamezne molekule.

Z razvojem tehnologije kolon in črpalk za visoke pritiske, ki zagotavljajo konstantne pretoke brez pulziranja, je postal HPLC sistem nepogrešljiv za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje spojin v kompleksnih vzorcih, kot na primer lesni ekstrakt. Kromatografsko analizo na HPLC sistemu odlikujejo hitrost, občutljivost, dobra ločljivost, majhna poraba

vzorca, relativno majhna poraba topila in večkratna uporaba kolone. Ena od odlik metod tekočinske kromatografije visoke ločljivosti je tudi analiza spojin v zelo širokem masnem območju. K vsem tem je potrebno dodati, da morajo pogoji HPLC analize omogočati, da v minimalnem času dosežemo zadovoljivo ločbo, in sicer na najcenejši način. Vedno torej iščemo kompromis med ločljivostjo, hitrostjo analize in ceno analize.



Slika 15: Shematski prikaz HPLC sistema (Waters, 2014).

V tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti ali pri visokih tlakih (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography, High Performance Liquid Chromatography) vzorec skupaj z mobilno fazo potiskamo skozi kolono pod visokim tlakom (od 400 do 600 barov). Kolona je lahko napolnjena z različno velikimi delci stacionarne faze (od $< 2 \mu\text{m}$ do $10 \mu\text{m}$). Z izbiro ustreznih kolon in ostalih pogojev dosežemo ločbo več komponent mešanice v nekaj minutah. Pri HPLC analizah je bistvenega pomena za hitro in zanesljivo ločbo poznavanje vzorca ter izbira stacionarne in mobilne faze. Sestavo oziroma polarnost mobilne faze lahko med kromatografsko analizo tudi spremojamo. Ta način imenujemo gradientno izpiranje za razliko od izokratskega, pri katerem ostane polarnost mobilne faze (lahko tudi večkomponentna) v času separacije nespremenjena (Arsenault in McDonald, 2007).

3 MATERIALI IN METODE

Za laboratorijsko preverjanje protitočne ekstrakcije, kot primerno metodo za ekstrahiranje pinosilvinov, smo uporabili žagovino rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.). Ločeno smo ekstrahirali žagovino jedrovine in grč. Osnovna osemfazna protitočna ekstrakcija se navezuje na industrijsko postavitev v podjetju Tanin Sevnica. Kasneje pa smo, na podlagi rezultatov preliminarnih poskusov, število faz zmanjšali na 5.

Pri preliminarnem poskusu smo za topilo uporabili destilirano vodo, segrevali 30 min pri temperaturi vrelišča (približno 100 °C). Ekstrakcija je bila zastavljena kot osemfazna in je vsebovala skupaj 10 ciklov. Po analizi rezultatov poskusne serije smo se odločili, da zmanjšamo število faz, saj od pete faze naprej iz lesa izločimo le še zanemarljivo količino topnih snovi. Določili smo, da ekstrakcije grč in jedrovine vodimo ločeno. Uporabili smo tri različne sisteme topil (destilirana voda, etanol vol. 50 %, etanol vol. 60 %, aceton vol. 95 %). Pri tem so sistemi, topni z etanolom in destilirano vodo predstavljeni topila primerna za potencialno uporabo ekstraktov v prehranskih izdelkih. Topilo z acetonom pa kot primer topila, v katerem se opazovane komponente najbolje raztapljamajo.

Vsebnost snovi smo ekstraktom določali s tremi različnimi tehnikami. Gravimetrično smo določili suhi ostanek, z UV-VIS celokupne fenole in s HPLC analizo, kjer smo primerjali koncentracije posameznih komponent v ekstraktu (pinosilvin in pinosilvin monometil eter).

3.1 IZBOR MATERIALA

S sodelavci iz Delovne skupine za kemijo lesa smo se odpravili v gozd, kjer smo iz debel dreves rdečega bora iz različne višine izrezali kolute (Slika 16) in jih označili.



Slika 16: Priprava kolutov iz debla (foto: Viljem Vek).

Kolute smo v laboratoriju za mehansko obdelavo poskobljali. Tako pripravljenim kolutom smo lažje določili starost, saj so branike dobro vidne. Pri tako svežem lesu smo jedrovino vizualno težko določili, zato smo si pri določanju jedrovine pomagali z jodovico. S čopičem smo nanesli radialni pas jodovice, kjer se je v kratkem času dobro videla razlika v odtenku obarvanja jedrovine in beljave (Slika 17). Nato smo iz kolutov izrezali vzorce jedrovine in vzorce grč in jih pripravili za mletje.

Jodovica je raztopina joda in kalijevega jodida. Uporablja se za dokazovanje škroba, katerega obarva modro, rjavo ali črno. S škrobom tvori kompleks, ki je modre barve, škrob - trijodidni ion (I_3 -škrob).



Slika 17: Določanje jedrovine in starosti kolutov (levo), vzorčenje (desno), (foto: Viljem Vek).

3.2 PRIPRAVA VZORCA

Na mlinu za mletje Retsch SM 2000 (Slika 18) smo vzorce ločeno zmleli. Da bi se izognili pregrevanju vzorcev in s tem morebitni degradaciji ekstraktivov v vzorcih, smo dodajali suhi led ($\text{CO}_{2(\text{S})}$). Pri mletju vzorcev smo morali biti zelo pozorni na čistočo, zato smo pred vsakim naslednjim vzorcem temeljito očistili celotni mlin in tako preprečili kontaminacijo med vzorci.



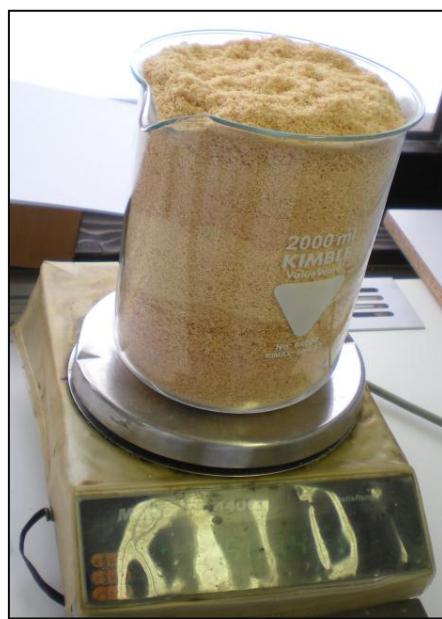
Slika 18: Mlin za mletje Retsch SM 2000.

Zmlete vzorce smo nasuli v ustrezno označene prahovke. Vzorce smo v sušilniku Kambič sušili na 60 °C do približno 10 % vlažnosti (Slika 19). Posušene vzorce smo združili v industrijski vzorec grč in industrijski vzorec jedrovine. Industrijski vzorec grč je vseboval približno eno tretjino mrtvih grč in dve tretjini živih grč, od tega pa približno polovico vzorca iz območja Koroške in polovico iz območja Brda (priloga 1). Oba industrijska vzorca smo dobro premešali in določili vsebnost vlage v surovini (enačba 1).



Slika 19: Sušenje vzorcev žagovine v prahovkah.

Za ekstrakcijo smo uporabili žagovino rdečega bora. Pripravili smo industrijski vzorec grč in jedrovine več dreves iz dveh različnih rastišč (Koroška, Brdo). Vzorec grč so sestavljal žive in mrtve grče. Vzorec jedrovine pa smo izdelali iz območja med strženom in prvo braniko beljave. Pripravljeno mešanico žagovine (Slika 20) smo dobro premešali, da smo dobili homogeno zmes industrijskega vzorca.



Slika 20: Zmes žagovine grč za industrijski vzorec.

3.3 UPORABLJENI REAGENTI IN TOPILA

Pri ekstrakciji smo uporabili tri različne sisteme topil, ki smo jih pripravili v laboratoriju.

- H_2O (destilirana voda)
- Etanol/ H_2O (50/50, v/v in 60/40, v/v)
- Aceton/ H_2O (95/5, v/v)

Pri delu smo uporabili tudi:

- galno kislino
- Folin Ciocaltau - jev reagent
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3)
- Metanol
- Jodovico
- Suhi led ($\text{CO}_2(\text{s})$)
- Mravljično kislino (HCOOH)

3.4 METODE

3.4.1 Določanje deleža suhe snovi

Delež suhe snovi smo določali industrijskim vzorcem žagovine, ker podajamo vsebnost ekstrahiranih snovi glede na delež absolutno suhega lesa.

En gram iz vsakega od vzorcev (m_2) žagovine smo odtehtali v posušen tehtič (m_1), ga postavili v sušilnik na temperaturo 105 °C, ga sušili en dan oziroma do konstantne teže. Vzorec žagovine smo ohladili v eksikatorju, ga ponovno stehtali (m_3) in po enačbi (2) izračunali vlažnost pripravljenega industrijskega vzorca. Tehtanje smo izvajali z analitsko tehnicco Mettler Toledo XS.

$$s.s. = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \quad \dots(2)$$

s.s. - suha snov

m_1 - masa tehtiča

m_2 - masa vzorca

m_3 - masa tehtiča z vzorcem po sušenju

3.4.2 Protitočna ekstrakcija

3.4.2.1 Preliminarni poskus - osemfazna protitočna ekstrakcija z vodo

Prvi primer osemfazne protitočne ekstrakcije z vodo smo izvedli v desetih ciklih, kot prikazuje spodnja slika (Slika 21). V bučke smo odtehtali 2,5 g žagovine jedrovine (PSB-133-J2-) in jo prelili s 100 mL destilirane vode in dodali tri vrelne kamenčke. Bučke smo segrevali v grelnih gnezdih na temperaturi vreliča (nastavljena temperatura 105 °C).

Na vsako bučko smo namestili urno stekelce, da bi omejili uhajanje topila. Vsaka faza ekstrakcije je trajala 30 min od pričetka vretja, nato pa smo vzorce prefiltrirali (Filtrak 389) in vsebino prelili v naslednjo bučko, kot prikazuje shema (Slika 21).



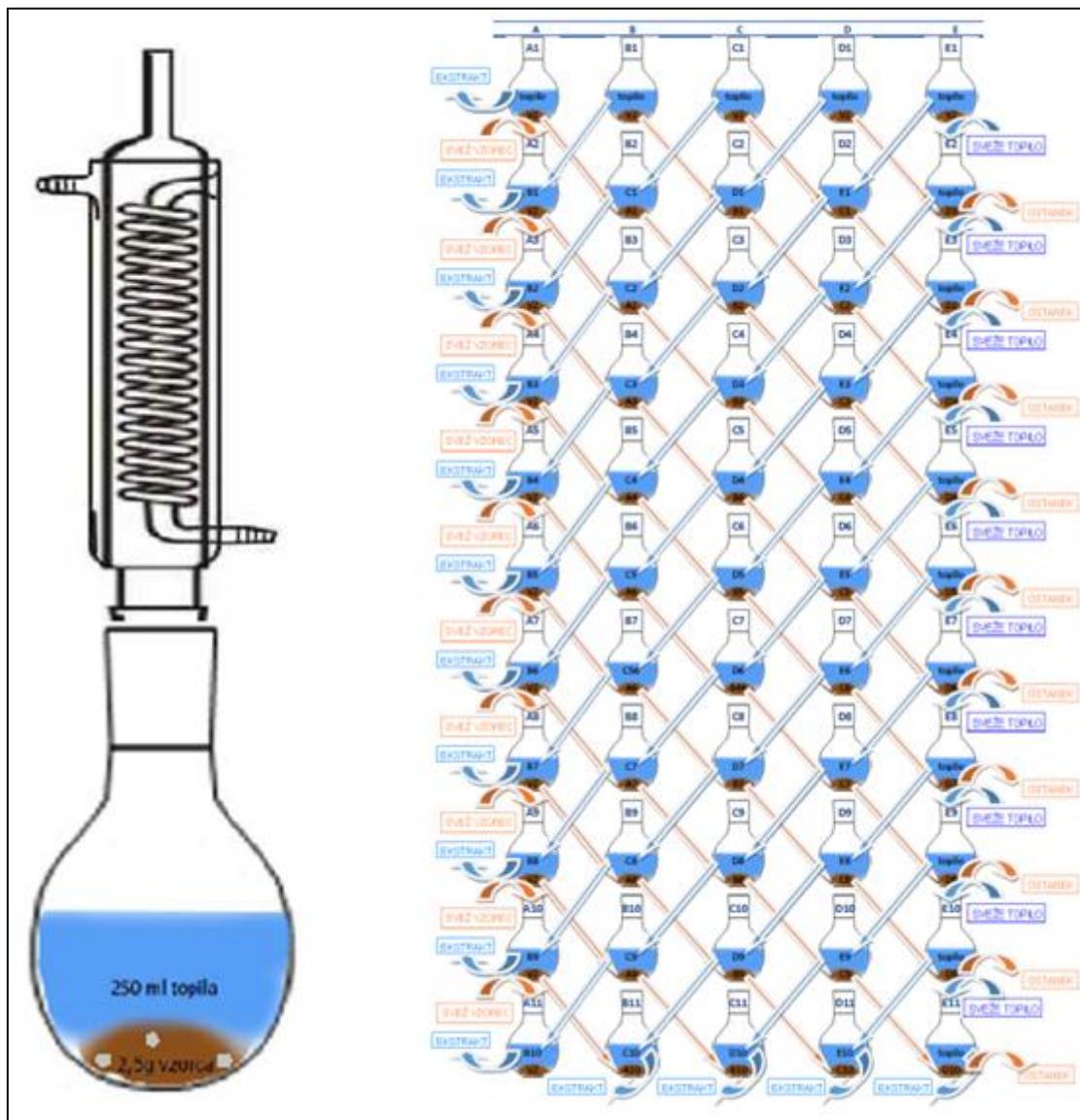
Slika 21: Shema osemfazne protitočne ekstrakcije z vodo.

Shema osemfazne protitočne ekstrakcije (Slika 21) prikazuje izvedbo eksperimenta po ciklih, ki so številčno označeni (1-10). V vsakem ciklu ekstrakcije je vključenih osem bučk (A-G) v katerih poteka ekstrakcija. Puščice med bučkami prikazujejo tok surovine (rjava) in topila (modra) v ekstrakciji. V vsaki bučki je zabeleženo iz katere bučke izhaja surovin (spodaj) in iz katere izhaja topilo (zgoraj). Sveže topilo v sistem vstopa iz desne, sveža surovin (žagovina) pa iz leve. Nasproti pa izhaja obogateno topilo in na drugi strani očiščena surovin. Za nadaljnjo analizo smo odvzeli vzorce ekstraktov, ki so izstopali iz sistema, kot so označene v shemi bučke z rdečo obrobo.

3.4.2.2 Petfazna protitočna ekstrakcija

Odločili smo se, da zmanjšamo število faz na pet in naredimo 11 ciklov, kot prikazuje shema (Slika 22). Povečali smo tudi količino topila, v katerem smo ekstrahirali žagovino. Da bi preprečili uhajanje topila, smo na bučke med potekom ekstrakcije namestili hladilnik hlapov (Slika 22). Po vsakem ciklu smo s pomočjo vodne vakuumski črpalk prefiltrirali ekstrakt. Topila in surovino smo pripravili za naslednji cikel, kot prikazuje shema (Slika 22), kjer modra barva predstavlja smer prehajanja topila, pot žagovine skozi sistem pa označuje rjava barva. Oba industrijska vzorca smo tako ločeno ekstrahirali v treh različnih sistemih topil po spodaj predstavljeni recepturi:

- 2,5 g vzorca,
- 250 ml topila
- nastavljena temperatura za:
 - H₂O, 115 °C,
 - Etanol: H₂O (50:50/ v:v), 105 °C,
 - Etanol: H₂O (60:40/ v:v), 100 °C,
 - Aceton: H₂O (95:5/ v:v), 80 °C
- filtrirni papir 389 (Filtrak)
- čas vretja 15 min



Slika 22: Shema petfazne protitočne ekstrakcije.

3.4.3 Suhi ostanek ekstrakta

Po končanem ekstrahiranju smo iz vseh vzorcev pridobili vse skupaj 120 ekstraktov petfazne protitočne ekstrakcije ter 17 vzorcev iz preliminarne ekstrakcije. Če predpostavimo, da so iskane komponente nehlajne snovi, raztopljene v topilu, je dejstvo, da naj suhi ostanek ne bi presegal mase opazovanih komponent. S tem smo določili zgornjo mejno vrednosti koncentracij, za vse nadaljnje metode.

Po ekstrakciji smo za vsak dobljen ekstrakt izračunali vsebnost suhega ostanka (s.o.). V osušene epruvete (m_2) smo odmerili 10 mL vzorca ga posušili v sušilniku Kambič pri 105 °C do konstantne teže (m_1). Epruvete smo po sušenju ohladili v eksikatorju in jih ponovno stehtali z analitsko tehnico Mettler Toledo XS. Suhi ostanek ekstrakta smo izračunali in podali v mg na gram absolutno suhega vzorca.

$$K.E. = \frac{(m_2 - m_1) \times 1000 \text{ mL}}{10 \text{ mL} (\text{s.s.} \times m_{\text{zat.}})} \quad \dots(3)$$

K.E. - količina ekstrahiranih snovi (mg/g)

s.s. - suha snov (/)

m_1 - masa suhe epruvete (g)

m_2 - masa epruvete z ekstrahiranimi snovmi (g)

$m_{\text{zat.}}$ - masa zatehtanega vzorca (g)

3.4.4 UV-VIS absorpcijska spektroskopija

UV-VIS absorpcijska spektroskopija je uveljavljena metoda za določanje vsebnosti celokupnih fenolov v ekstraktih vzorcev. Spektrofotometer meri absorbanco žarkov, ki presvetljujejo analizirani vzorec glede na intenziteto vpadnega žarka. Za meritev raztopin z neznano koncentracijo smo pripravili umeritveno premico, na podlagi meritev, opravljenih na znanih koncentracijah galne raztopine. Ob dodatku reagenta FC (Folin Ciocaltau) so se vzorci sorazmerno obarvali glede na vsebnost celokupnih fenolov (Slika 23).



Slika 23: Vzorci vodnih ekstraktov po dodanem reagentu celokupnih fenolov.

Priprava reagentov in spektrofotometričnega standarda:

- Priprava raztopine FC (Folin Ciocaltau):

Zmešamo vodno raztopino FC (Folin Ciocaltau) v razmerju 9:1 (voda: FC).

- Priprava raztopine natrijevega karbonata (Na_2CO_3):

7,5 % vodno raztopino pripravimo tako, da 100 mL H_2O raztopimo 7,5 g Na_2CO_3 .

- Priprava znanih koncentracij galne kisline:

Osnovno raztopino galne kisline (500 mg/L) pripravimo tako, da 0,2765 g galne kisline raztopimo v 5 mL metanola in prelijemo z 500 mL H_2O . Vse ostale raztopine pa pripravimo tako, da osnovno raztopino redčimo z destilirano vodo.

Znane koncentracije galne kisline:

- I. 500 mg/L
- II. 400 mg/L
- III. 300 mg/L
- IV. 250 mg/L
- V. 125 mg/L
- VI. 62,5 mg/L
- VII. 31,25 mg/L
- VIII. 15,6 mg/L
- IX. 7,8 mg/L

Priprava vzorcev za UV- VIS:

0,5 mL vzorca smo prelili z 2,5 mL FC in 2 mL Na_2CO_3 . Po končani inkubaciji (180 min) smo določili absorbance vzorcev z UV-VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 765 nm. Za vsak sklop vzorcev smo napravo najprej umerili s slepim vzorcem (čisto topilo). Potem pa smo najprej izmerili absorbance znanih koncentracij galne kisline. Iz devetih vzorcev galne kisline smo izdelali umeritveno premico, za vsak sklop ekstraktov posebej, s pomočjo katere smo iz absorbance po enačbi (4) izračunali koncentracijo celokupnih fenolov v naših vzorcih.

$$\gamma = \frac{A_{765} - n}{k} \quad \dots(4)$$

γ - masna koncentracija celokupnih fenolov (mg/L)

A_{765} - absorbanca pri valovni dolžini 765

n - ničla umeritvene premice

k - koeficient umeritvene premice

Vsebnost celokupnih fenolov (C.F.) smo podali na podlagi predhodno izračunanih masnih koncentracij celokupnih fenolov (γ), pri čemer smo upoštevali volumen topila (v_t) maso vzorca (m_v) in njegovo vlažnost (s.s.).

$$C.F. = \frac{\gamma \times V_t}{m_{zat. \times s.s.}} \quad \dots(5)$$

C.F. - vsebnost celokupnih fenolov (mg/g)

γ - masna koncentracija celokupnih fenolov (mg/L)

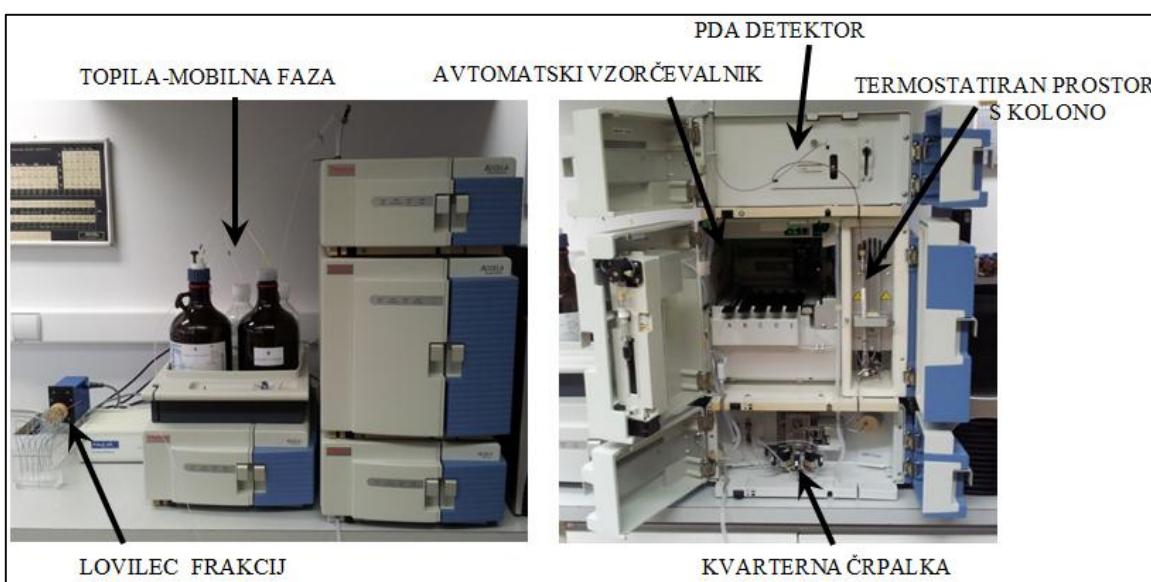
V_t - volumen topila (L)

$m_{zat.}$ - masa zatehtanega vzorca (g)

s.s. - suha snov (/)

3.4.5 HPLC analiza lesnih ekstraktov bora

Vzorce oziroma ekstrakte lesa in grč bora smo analizirali z Accela tekočinskim kromatografom proizvajalca Thermo Fischer Scientific, modularnim HPLC sistemom (Slika 24), ki je opremljen z Accela kvarterno črpalko (delovnim tlakom do 600 barov). Sistem je opremljen z avtomatskim vzorčevalnikom, ki je termostatiran. Poleg tega je termostatiran tudi prostor za kolone.



Slika 24: Thermo Fischer Scientific Accela HPLC modularni sistem (Vek, 2013).

S HPLC sistemom smo izmerili retencijske čase in po enačbi 5 izračunali koncentracije posameznih spojin v ekstraktu.

$$\text{Delež PS} = \frac{\gamma_{PS} \times V_t}{m_{zat.} \times s.s.} \quad \dots(5)$$

Delež PS - delež pinosilvina (mg/g)

γ_{PS} - koncentracija pinosilvina (mg/L)

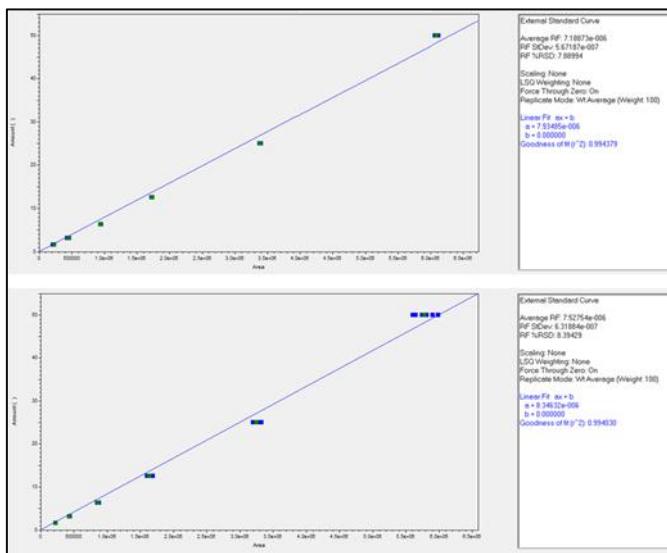
V_t - volumen topila (L)

$m_{zat.}$ - masa zatehtanega vzorca (g)

s.s. - suha snov (/)

Pred meritvijo smo pripravili raztopine standardnih spojin visoke čistoče ustreznih koncentracij (PS in PSMME čistoče 97 % (HPLC), proizvajalca Sigma-Aldrich Chemie), na podlagi katerih smo izdelali umeritvene krivulje (Slika 25). Kromatografska metoda je bila v izbranem območju linearna, pri čemer je bil kvadrat korelacijskega koeficienta za posamezno spojino večji od 0,99 ($r^2 \geq 0,99$) (Silva in sod., 2014).

V tej analizi smo ločeno spremljali koncentracijo dveh stilbenov v lesnih ekstraktih bora, in sicer pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra.



Slika 25: Kalibracijski premici za pinosilvin (zgoraj) in pinosilvin monometilni eter (spodaj). Območje linearnosti ($r^2 \geq 0,99$).

3.4.5.1 Priprava vzorcev za HPLC analizo

Vzorce ekstraktov smo posušili v vakuumu pri sobni temperaturi (23 °C) in nato iz njih pripravili metanolne raztopine vzorcev. Tako pripravljene vzorce smo prefiltrirali skozi najlonske filtre (Chromafil 0,45µm) in analizirali s HPLC sistemom. Kromatografska ločba je potekala na Accucore PFP koloni (dimenzijs: 2,1 mm × 150 mm), polnjeni s 2,6 µm delci stacionarne faze. Kolona je bila termostatirana na 30 °C. Mobilno fazo sta sestavljeni dve topili, in sicer metanol (topilo A) ter voda (topilo B) ob dodatku 0,1 % mravljinčne kisline (v/v). Za ločbo ekstraktivov bora smo uporabili 10 minutni gradient topila A (od 5 % do 95 %), pri čemer je pretok mobilne faze znašal 400 µL/min. Ločene ekstraktive smo detektirali s PDA detektorjem pri 275 nm, za namene identifikacije posamezne spojine pa je bil posnet tudi spekter od 200 do 400 nm. Identifikacijo vrhov smo izvedli na osnovi primerjave retencijskih časov in UV spektrov ločenih komponent s časi in spektri ustreznih internih standardov.

4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST SUHE SNOVI

Posebej pripravljenim vzorcem za pet in osemfazno ekstrakcijo smo gravimetrično določili vsebnost suhe snovi. V tehtič smo z analitsko tehnicco Mettler Toledo XS odtehtali 1 g vzorca žagovine, ga posušili v sušilniku do konstantne teže, ponovno stehtali (priloga 2) in izračunali vsebnost suhe snovi (preglednica 2). Izračunana vsebnost suhe snovi (enačba 2) je bila osnova za vse nadaljnje izračune.

Preglednica 2: Delež suhe snovi v vzorcu žagovine grč in jedrovine rdečega bora.

VZOREC	SUHA SNOV (/)
PSB-133-J2-*	0,9921
GRČE	0,9204
JEDROVINA	0,9223

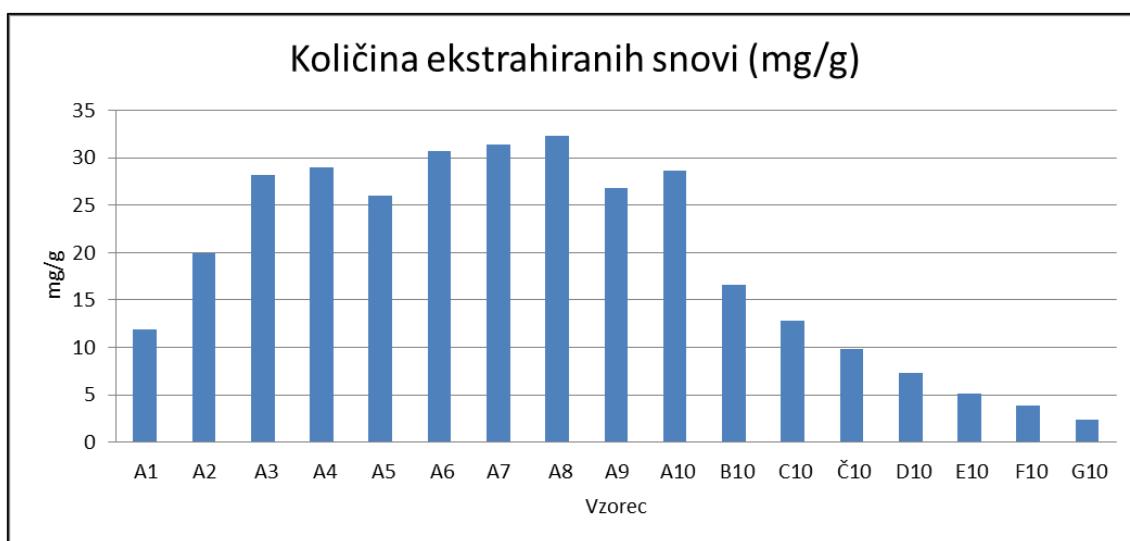
*vzorec jedrovine, uporabljen pri osemfazni protitočni ekstrakciji

4.2 EKSTRAKCIJSKI IZKORISTKI OSEMFAZNE PROTITOČNE EKSTRAKCIJE Z VODO

4.2.1 Količina ekstrahiranih snovi

Epruvete, posušene v sušilniku Kambič in ustrezno označene, smo stehtali na analitski tehnicci Mettler Toledo XS. Vanje smo s pipeto odmerili 10 mL vzorca ekstrakta in ga v sušilniku posušili do absolutno suhega. Epruvete smo ponovno stehtali, odšteli maso epruvete in dobili maso ekstrahiranih snovi. Masa ekstrahiranih snovi predstavlja količino vseh vodotopnih snovi, ki jih je bilo mogoče z vodo ekstrahirati iz vzorca lesa rdečega bora. Količino vodotopnih snovi smo podali v miligramih ekstrahiranih snovi na gram absolutno suhega vzorca žagovine. Mase ekstrahiranih snovi vzorcev so predstavljene v prilogi 3.

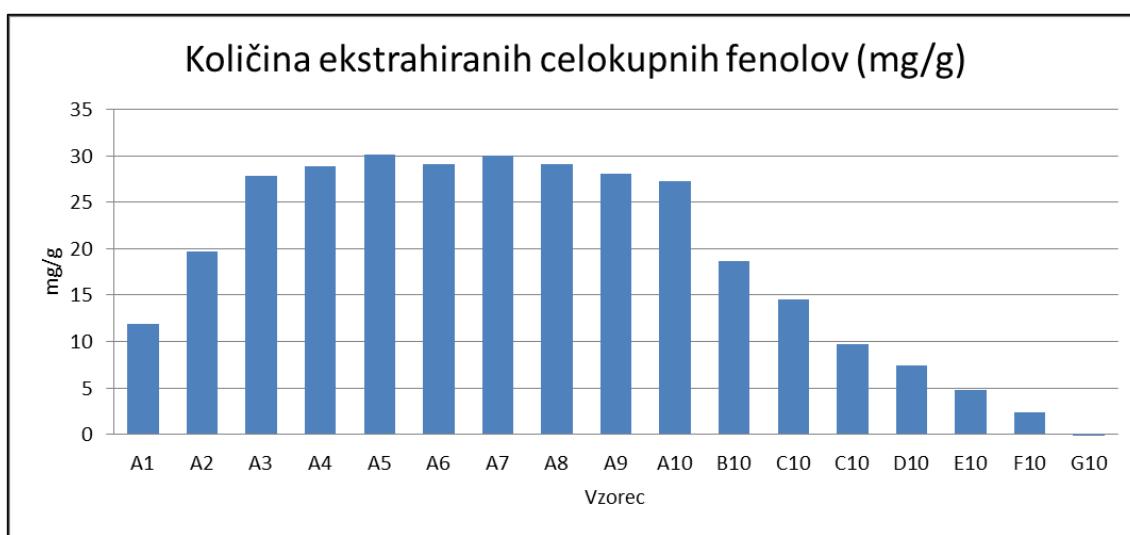
Pri preliminarnem poskusu osemfazne protitočne ekstrakcije, je vidno eksponentno naraščanje količine ekstrahiranih snovi (Slika 26) iz faze v fazo (G10-A10). Tako v osmi fazi protitočne ekstrakcije (A10) dosežemo občutno višje koncentracije, kot pri enkratni ekstrakciji (A1).



Slika 26: Količina z vodo ekstrahiranih snovi iz vzorca jedrovine v sistemu osemfazne protitočne ekstrakcije.
Vrednosti so podane v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

4.2.2 Količina ekstrahiranih celokupnih fenolov

Za določanje koncentracije celokupnih fenolov v ekstraktu, ki smo ga pridobili z vodo, smo na podlagi znanih koncentracij galne kisline za vsak vzorec posebej izdelali umeritveno krivuljo (priloga 4). Na podlagi umeritvene krivulje smo nato izračunali koncentracije celokupnih fenolov (priloga 5) in jih podali v miligramih na gram absolutno suhega lesa (Slika 27).

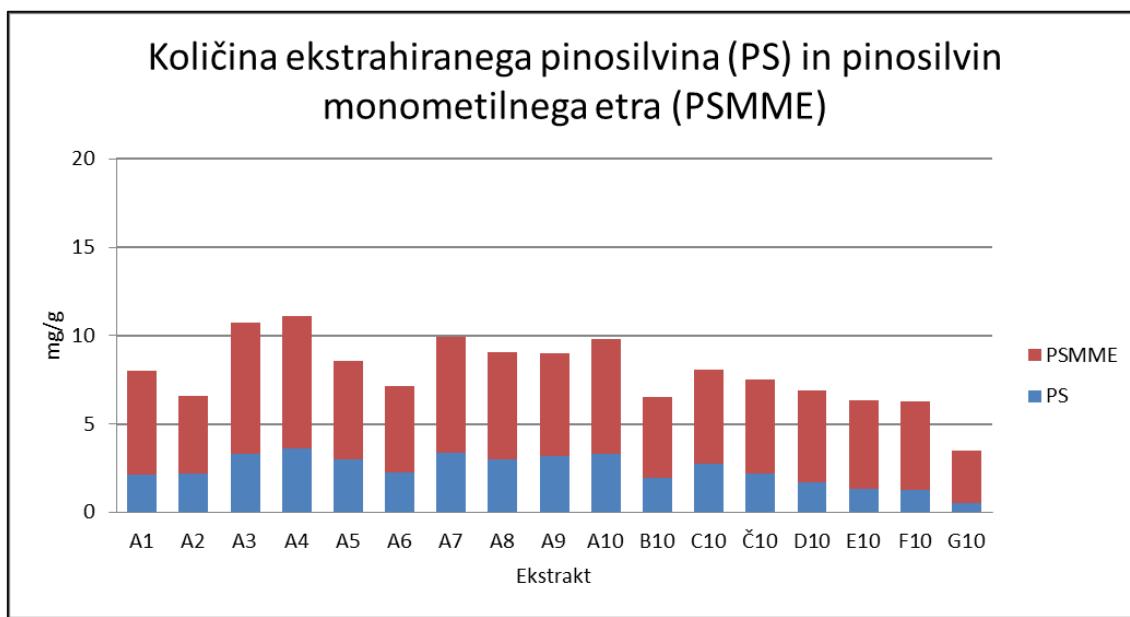


Slika 27: Količina iz jedrovine ekstrahiranih celokupnih fenolov v sistemu osemfazne protitočne ekstrakcije z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

Na grafičnem prikazu (Slika 27) je dobro vidno eksponentno naraščanje koncentracije celokupnih fenolov v vodnih ekstraktih osemfazne protitočne ekstrakcije. Iz faze v fazo vsebnost narašča (G10-A10). Po osmih fazah (A10) smo v ekstraktu določili višjo vsebnost celokupnih fenolov, kot pri enkratni ekstrakciji (A1).

4.2.3 Količina ekstrahiranega pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra

Prisotnost in količine pinosilvina (PS) ter pinosilvin monometilnega etra (PSMME) smo izmerili s pomočjo HPLC analize vodnih ekstraktov osemfazne protitočne ekstrakcije. HPLC analiza ekstraktov preliminarnega poskusa (Slika 28) je pokazala, da koncentracija PS in PSMME narašča iz faze v fazo (G10-A10), vendar ni opaznejše razlike od koncentracije, dobljene z enkratno ekstrakcijo (A1). S primerjavo ekstrahiranega PS in PSMME in količino ekstrahiranih snovi opazimo, da prisotnost PS in PSMME ne narašča sorazmerno s količino ekstrahiranih snovi (Slika 26). Menimo, da je razlog za to nasičenje topila z opazovanimi komponentami.



Slika 28: Količina iz jedrovine ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri osemfazni protitočni ekstrakciji z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

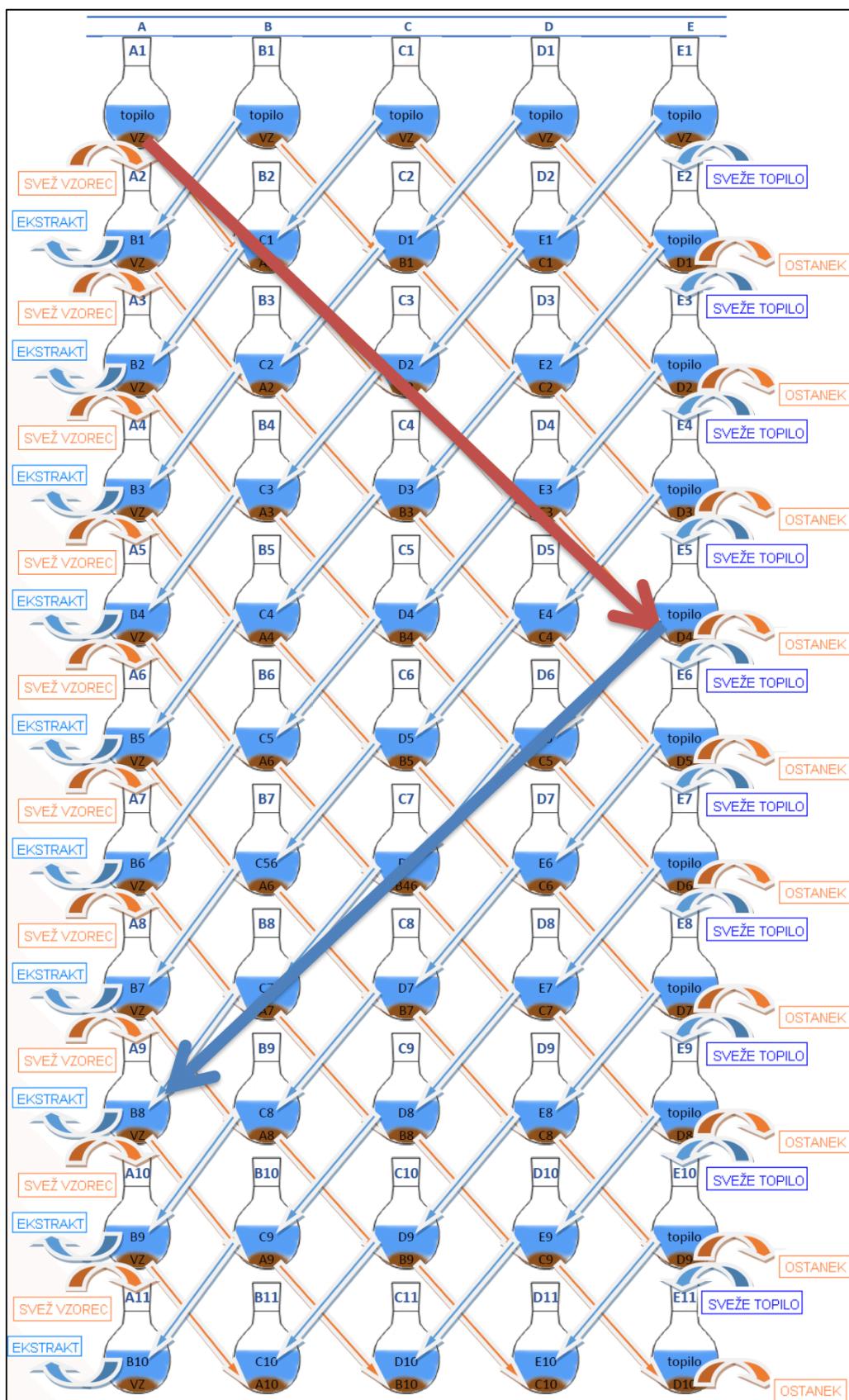
4.3 IZKORISTEK PETFAZNE PROTITOČNE EKSTRAKCIJE Z UPORABO RAZLIČNIH TOPIL

S preliminarnim poskusom osemfazne protitočne ekstrakcije smo želeli preveriti in določiti parametre in potek ekstrakcije. Protitočna ekstrakcija se je izkazala za primeren način pridobivanja pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME). Na podlagi ugotovitev iz preliminarnih testov smo se odločili povečati koncentracijo topila in zmanjšati izhlapevanje topila med ekstrakcijo.

Tako smo se odločili, da povišamo količino topila s prvotnih 100 mL na 250 mL. Ker ekstrakcija poteka pri temperaturi vrelišča, smo na vsako bučko namestili vodni hladilnik, ki je vračal pare topila nazaj v sistem. S tem smo se izognili izgubam topila med ekstrakcijo, kar bi pomenilo spremembo koncentracije topila. Osnovnemu topilu (H_2O) smo dodali še tri sisteme topil (etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)) in aceton/ H_2O (95/5 (v/v))). Povečali smo število ciklov, da smo dobili več ekstraktov, ki predstavljajo produkt protitočne ekstrakcije. Tako smo kasneje iz treh produktov petfazne protitočne ekstrakcije izračunali povprečne vrednosti in med seboj primerjali učinkovitosti topil. V nadaljevanju

smo eksperiment vodili kot petfazno protitočno ekstrakcijo, zaradi tehničnih in izvedbenih razlogov. V tem poglavju so predstavljeni rezultati petfazne protitočne ekstrakcije v 11 ciklih. Vsak cikel ekstrakcije je trajal 15 minut pri temperaturi vrelišča posameznega topila.

Petfazna protitočna ekstrakcija (Slika 29) se prične, ko s svežim topilom obdelamo štirikrat izpran (E5) vzorec lesa in ko s tem ekstraktom izperemo še štiri nadaljnje vzorce lesa, dobimo produkt petfazne protitočne ekstrakcije. Tako ekstrakt vzorca A9 prikazuje prvi realen rezultat petfazne protitočne ekstrakcije.

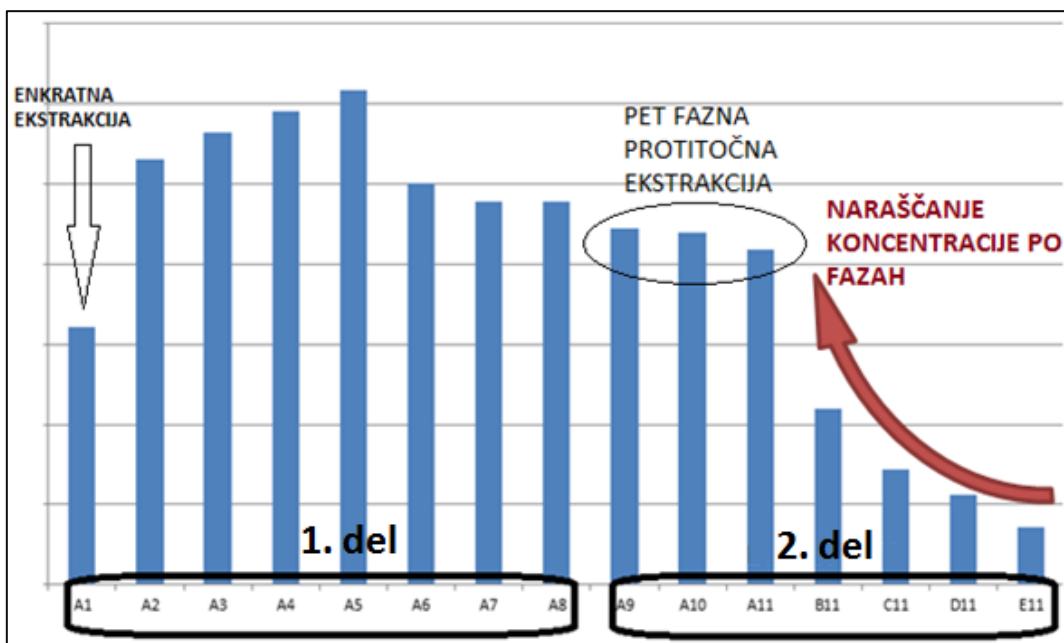


Slika 29: Shema petfazne protitočne ekstrakcije z enajstimi ponovitvami.

Za lažje razumevanje količine ekstrahiranih snovi v posameznem delu protitočne ekstrakcije smo rezultate razdelili na dva dela (Slika 30). V prvem delu (A1-A8) se formirajo pogoji za potek protitočne ekstrakcije.

Drugi del predstavljajo vzorci (A9, A10, A11), ki predstavljajo produkte petfazne protitočne ekstrakcije in pa vzorci (E11-A11), ki predstavljajo naraščanje koncentracije ekstraktov od prve do pете faze.

Vzorec A1 predstavlja količino izpranih snovi enkratne ekstrakcije žagovine s svežim topilom.

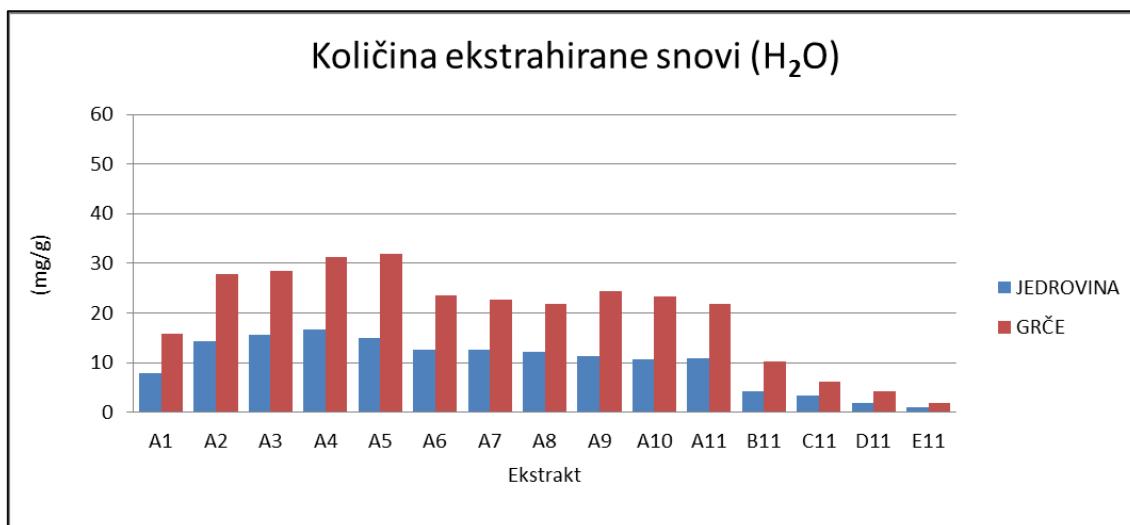


Slika 30: Interpretacija količin ekstrahiranih snovi v vzorcih pri sistemu petfazne protitočne ekstrakcije.

4.3.1 Ekstrakcijska učinkovitost petfazne protitočne ekstrakcije z vodo

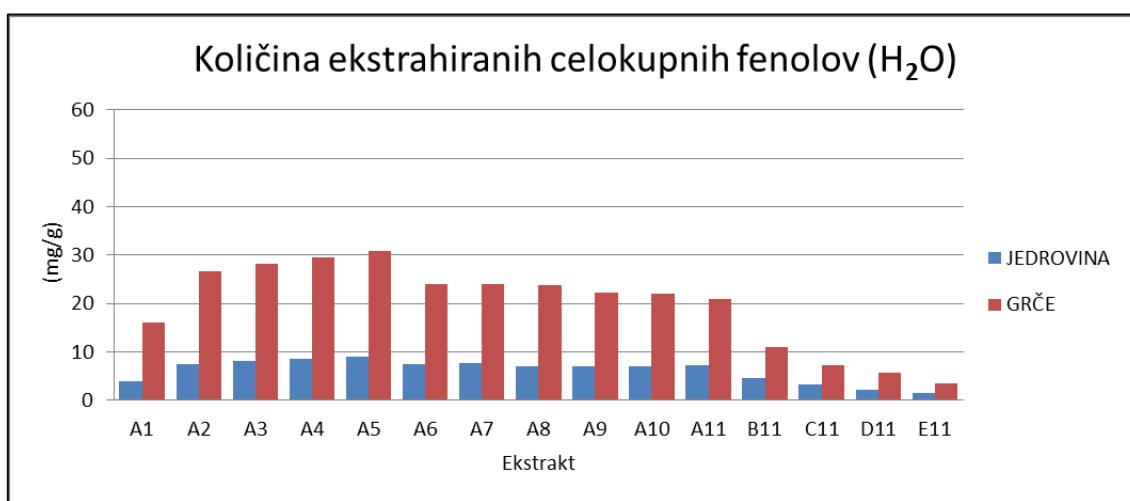
Količina vodotopnih snovi, ki smo jih ekstrahirali po petfazni protitočni ekstrakciji, je prikazana na Slika 31. V destilirani vodi se ekstraktibilne snovi dokaj počasi razapljujo, kar dokazuje postopno naraščanje količine ekstrahiranih snovi pri vzorcih od E11-A11. Tako s petfazno protitočno ekstrakcijo (A9, A10, A11) dosežemo za polovico višje

vsebnosti, kot pri enkratni ekstrakciji (A1). Količina ekstrahiranih snovi je v vseh fazah protitočne ekstrakcije večja v grčah kot v jedrovini (Slika 31).



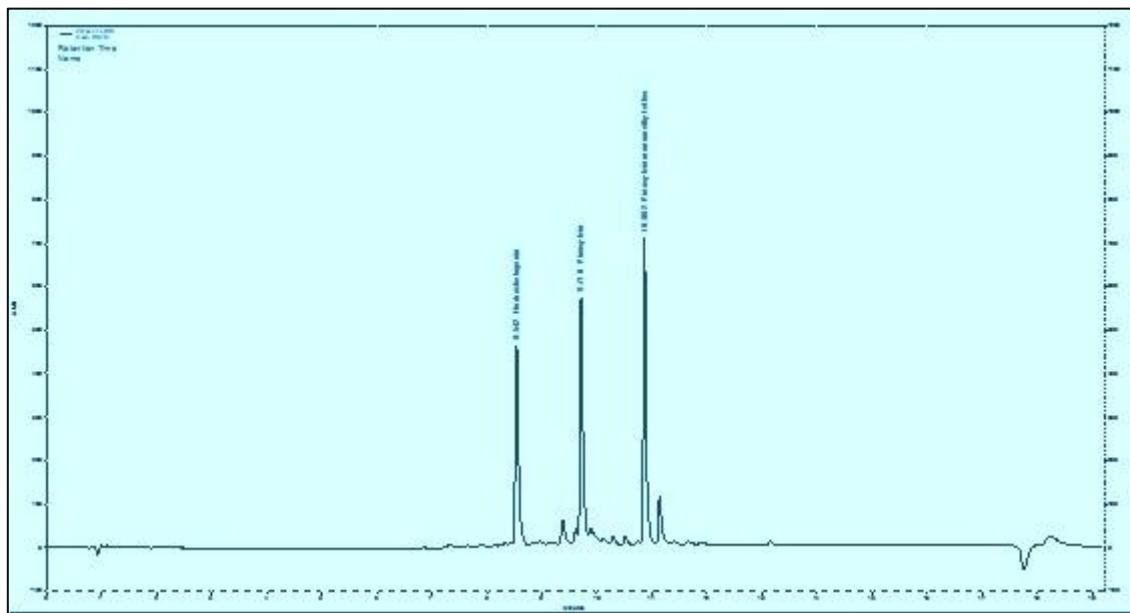
Slika 31: Količina ekstrahiranih snovi v petfazni protitočni ekstrakciji lesa jedrovine in grč z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

Kot primeren način za oceno vsebnosti pinosilvinov se je izkazala UV-VIS metoda, kjer smo z določeno koncentracijo galne kisline simulirali celokupne fenole. Iz teh rezultatov smo kasneje primerjalno izračunali vsebnost celokupnih fenolov v naših vzorcih (Slika 32). S petimi fazami ekstrakcije (A9-A11) dosežemo višje koncentracije, kot z enkratno ekstrakcijo (A1). Količina celokupnih fenolov je v grčah tudi do trikrat večja kot v jedrovini.



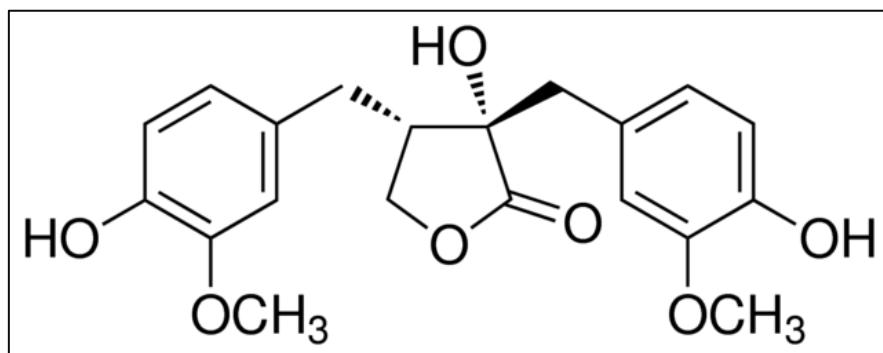
Slika 32: Količina celokupnih fenolov pri petfazni protitočni ekstrakciji z vodo. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

Sledila je preiskava ekstraktov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), pri čemer smo najprej izvedli kvalitativno, nato pa tudi kvantitativno analizo vzorcev. Na Sliki 33 je prikazan kromatogram vodnega ekstrakta grč rdečega bora.



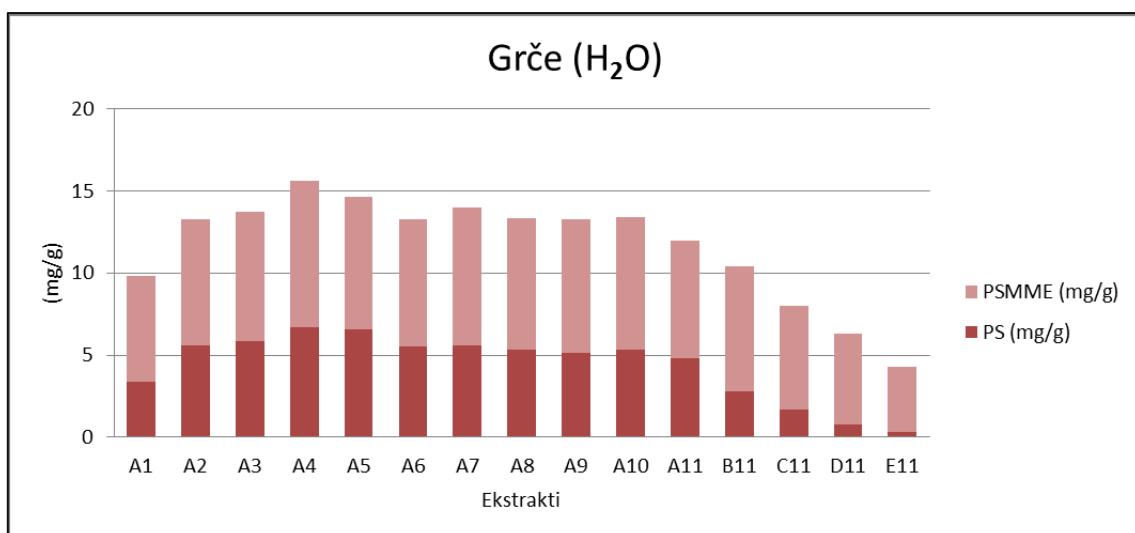
Slika 33: Kromatogram vodnega ekstrakta grč rdečega bora (GA5-H₂O).

Vodni ekstrakt grč vsebuje tri dominantne spojine, nortrahelogenin (NTG, $t_r = 8,52$ min), pinosilvin (PS, $t_r = 9,687$ min) in pinosilvin monometilni eter (PSMME, $t_r = 10,852$ min). Nortrahelogenin (Slika 34) je lignan, ki se pojavlja v lesu številnih iglavcev, pri boru pa je prisoten samo v grčah, v jedrovini pa ga nismo določili, kar navajajo tudi viri (Willförl in Hemming, 2003).



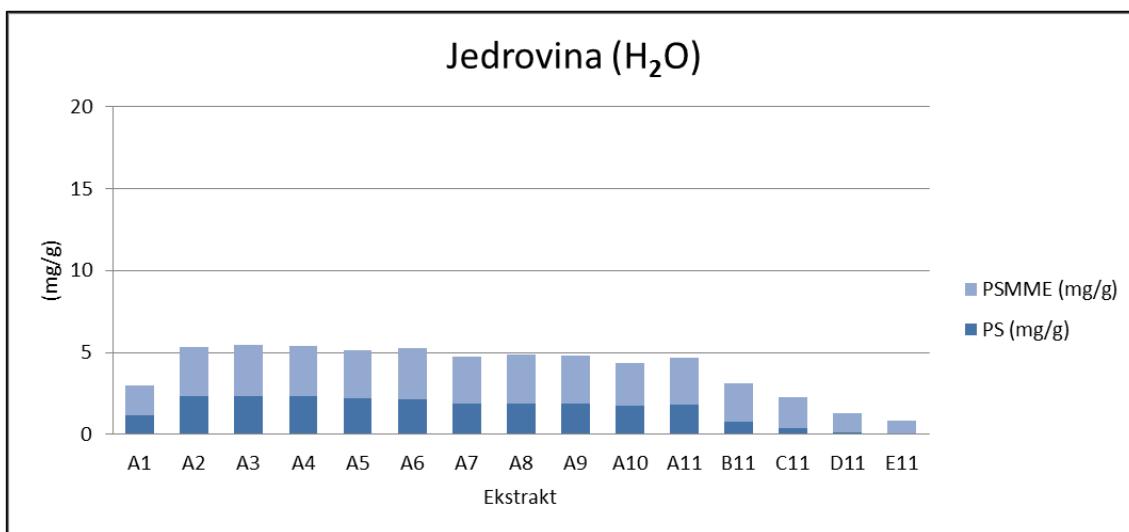
Slika 34: Strukturna formula lignana, nortrahelogenin (NTG).

V nadaljevanju smo določili koncentracije pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) za vsak vzorec posebej. Dobljene kromatograme smo obdelali v programu ChromQuest 5.0, kjer smo določili območje integracije. Pri integraciji smo določili površino vrha za posamezno spojino in na podlagi umeritvenih krivulj določili masno koncentracijo preiskovanih spojin. Končne rezultate smo izrazili v gramih identificirane spojine na gram absolutno suhega lesa (mg/g).



Slika 35: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri petfazni protitočni ekstrakciji grč z vodo.

Količina ekstrahiranih snovi (PS in PSMME) v ekstraktih grč (Slika 35) je do trikrat višja od količin v jedrovinskih ekstraktih (Slika 36). Kljub temu razmerje PS in PSMME, pri vodnih ekstraktih grč in vodnih ekstraktih jedrovine ostaja enako (Slika 35, Slika 36).

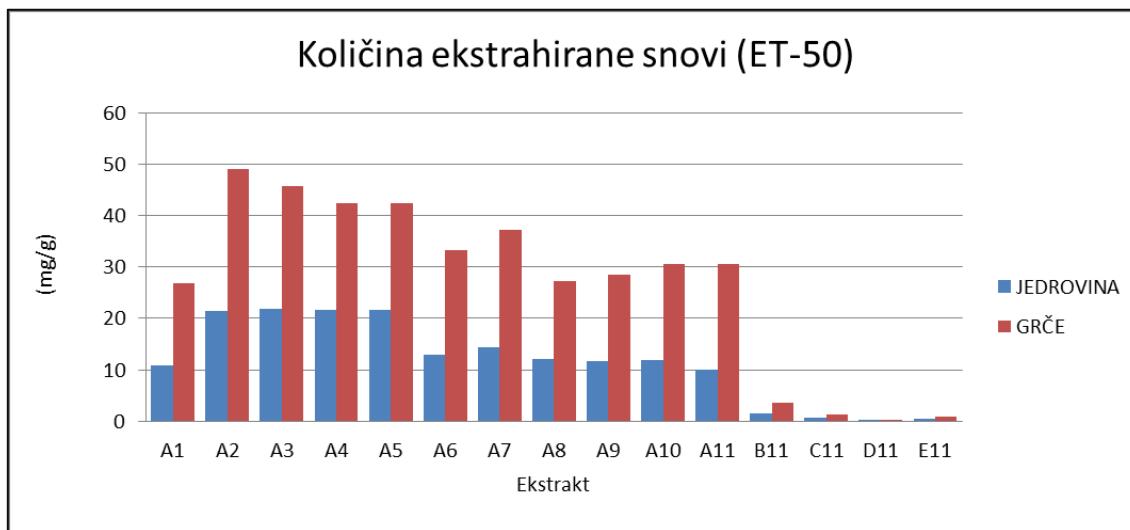


Slika 36: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri petfazni protitočni ekstrakciji jedrovine z vodo.

4.3.2 Ekstrakcijska učinkovitost petfazne protitočne ekstrakcije z vodno raztopino etanola

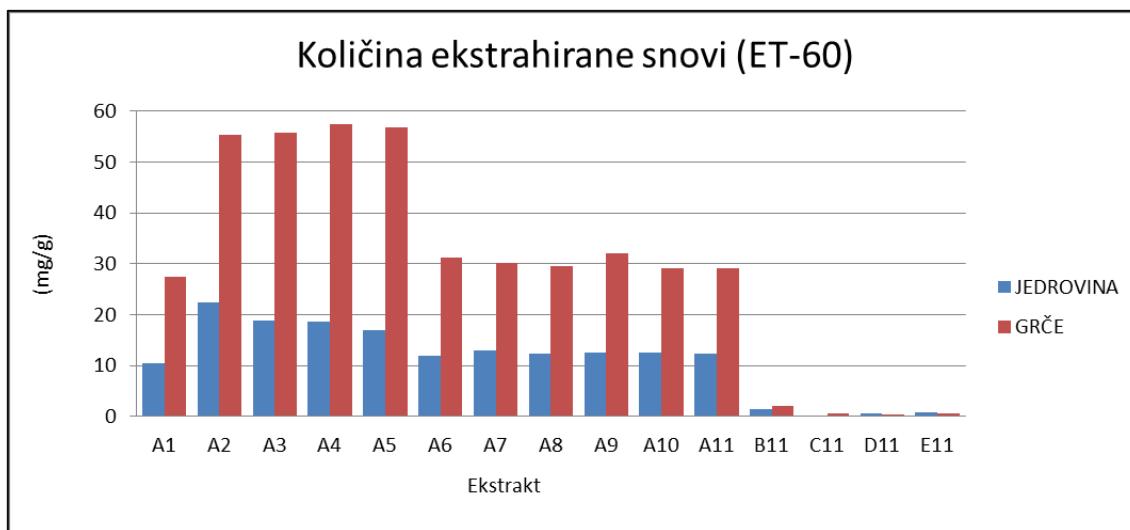
V tem delu raziskave smo primerjali dva sistema topil različnih volumskih razmerij destilirane vode in etanola (etanol/H₂O (50/50, 60/40 (v/v)).

Etanol očitno pospeši izločanje opazovanih snovi, saj pri sistemih topil, kjer smo dodali etanol, že z enim izpiranjem (A1) izločimo več snovi, kot pri ekstrakciji z vodo (Slika 31). S petimi fazami (A9-A11) tako dosežemo le nekoliko višje koncentracije, kot pri enkratnem izpiranju (A1), (Slika 37, Slika 38).



Slika 37: Količina ekstrahirane snovi v etanolnih ekstraktih (vol. 50 %) petfazne protitočne ekstrakcije.
Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

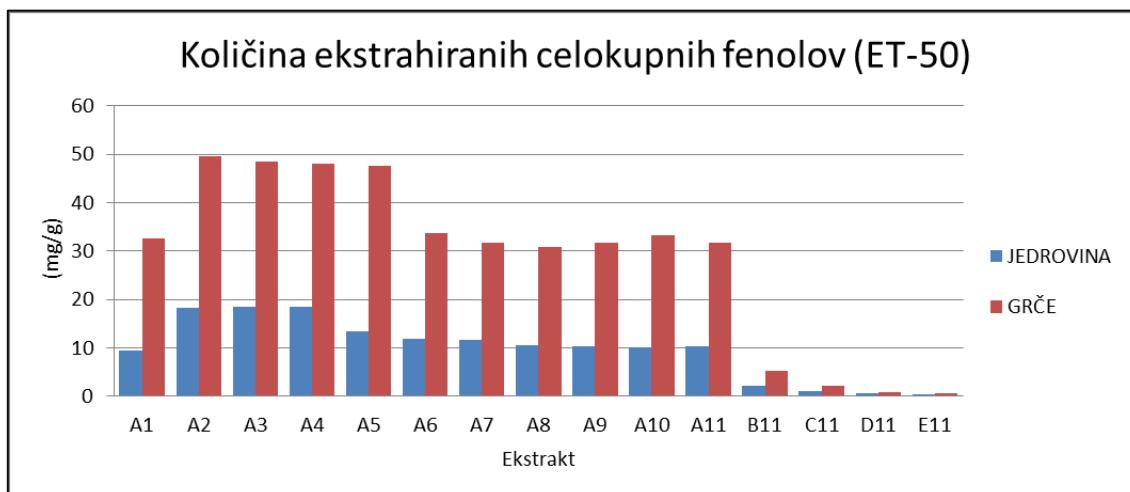
S primerjavo količin ekstrahiranih snovi v etanolnih ekstraktih opazimo razliko v prvem delu grafa (A2-A5), kjer se je topilo z višjo vsebnostjo etanola (ET60 - (etanol/H₂O 60/40 (v/v))) izkazalo za bolj učinkovitega od topila (ET50 - (etanol/H₂O 50/50 (v/v))). Iz tega sklepamo, da pri topilu ET50 koncentracija (pribl. 45 mg/g) ekstrahiranih snovi pri grčah predstavlja nasičenje topila.



Slika 38: Količina ekstrahirane snovi v etanolnih ekstraktih (vol. 60 %) petfazne protitočne ekstrakcije.
Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

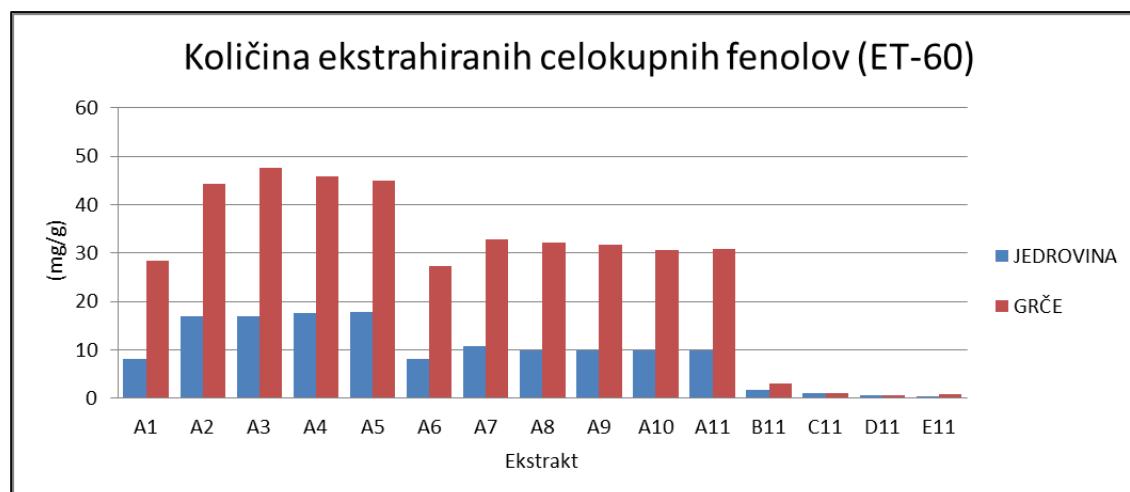
Z metodo UV-VIS smo v vodnih ekstraktih nadalje izmerili vsebnost celokupnih fenolov. Koncentracije celokupnih fenolov, raztopljenih v etanolnih ekstraktih, so pri petfazni (A9-

A11) in enkratni ekstrakciji (A1) primerljive. Iz tega sklepamo, da z višanjem števila ciklov (B11-E11) iz lesa ne izločimo višje koncentracije celokupnih fenolov (Slika 39, Slika 40), kot to velja za vodne ekstrakte (Slika 32).



Slika 39: Koncentracija celokupnih fenolov v etanolnih ekstraktih (vol. 50 %) pri petfazni protitočni ekstrakciji. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

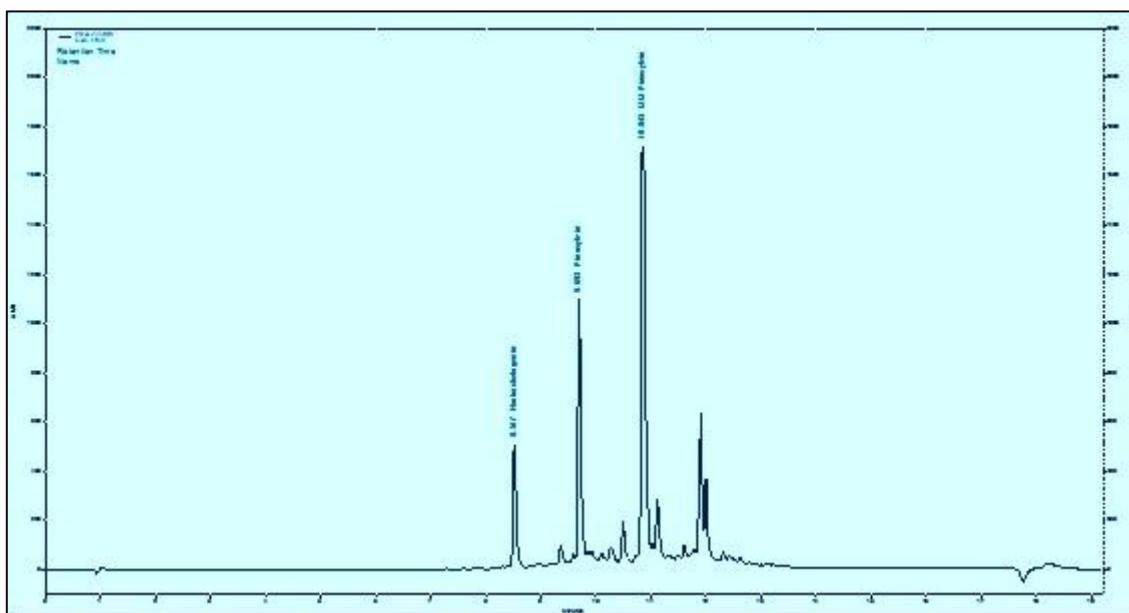
Količine ekstrahiranih celokupnih fenolov (Slika 39, Slika 40) pri ekstraktih iz grč in jedrovine so podobne za obe uporabljeni etanolni topili (ET50 in ET60).



Slika 40: Koncentracija celokupnih fenolov v etanolnih ekstraktih (vol. 60 %) pri petfazni protitočni ekstrakciji. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

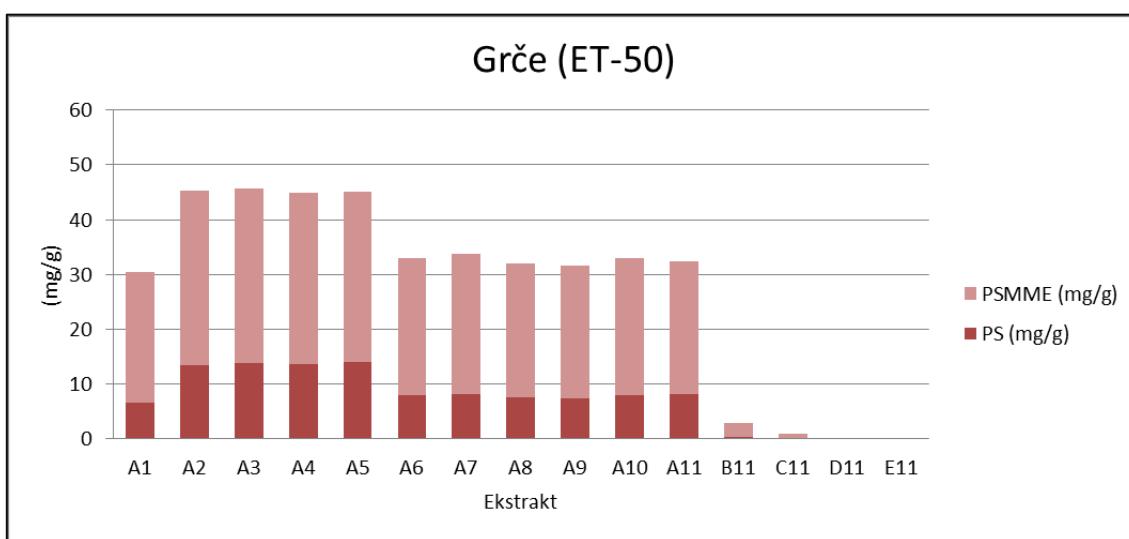
V nadaljevanju smo učinkovitost etanolnih topil primerjali s HPLC analizo. Iz kromatogramov (Slika 41) smo določili območje integracije in kvantitativno ovrednotili

vsebnosti spojin. Količine pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME), smo izrazili v miligramih na gram absolutno suhega lesa.



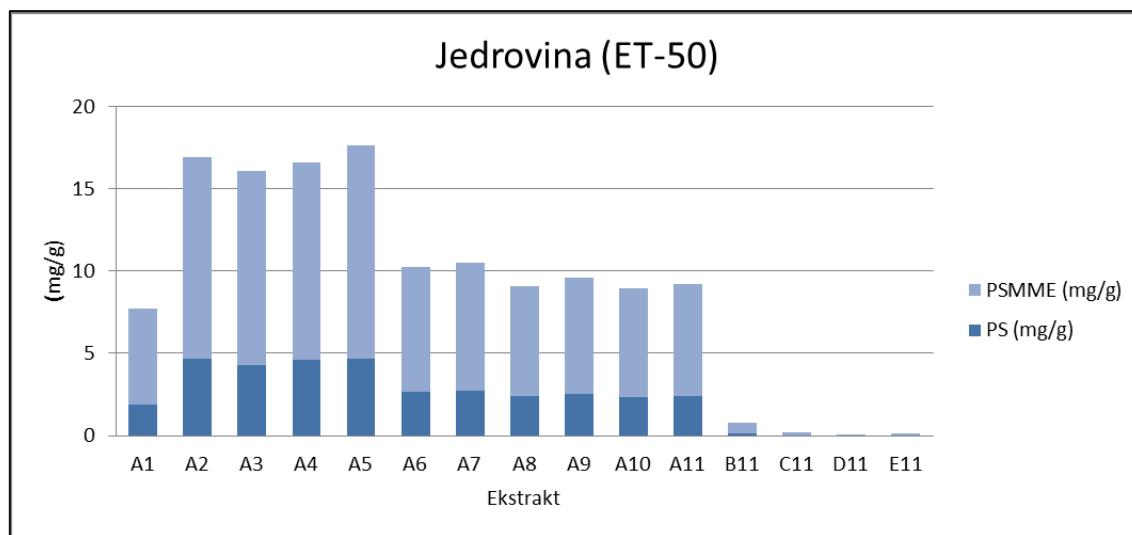
Slika 41: Kromatogram etanolni ekstrakta grč bora (GA5-ET60).

Rezultati HPLC analize ekstraktov grč in jedrovine, ki smo jih pridobili z uporabljenimi sistemi topil, so predstavljeni grafično (Slika 42, Slika 43, Slika 44, Slika 45). Pri vseh ekstraktih je bila vsebnost pinosilvin monometilnega etra približno trikrat višja od vsebnosti pinosilvina.



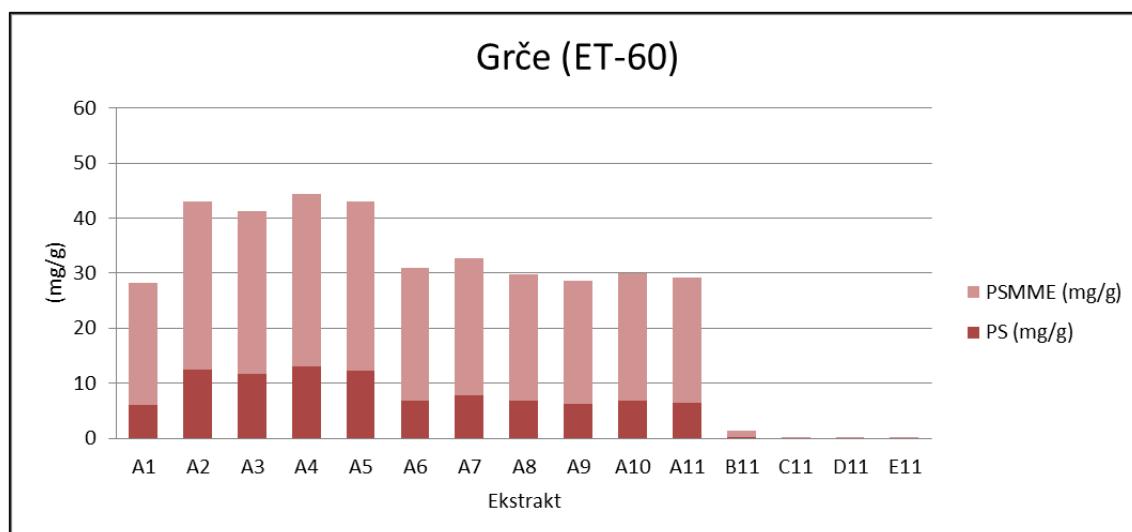
Slika 42: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih grč (vol. 50 %) petfazne protitočne ekstrakcije.

Količina ekstrahiranih spojin (PS in PSMME) so pri grčah tudi za več kot trikrat večje, vendar razmerje med PS in PSMME ostaja enako.



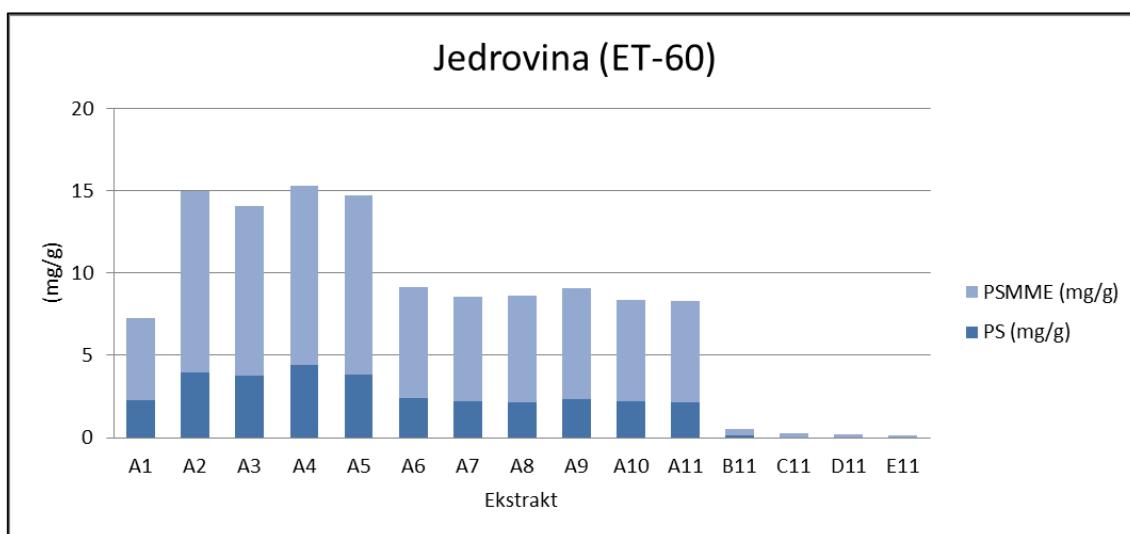
Slika 43: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih jedrovine (vol. 50 %) petfazne protitočne ekstrakcije.

Topila, katerim smo dodali etanol, so se pri ekstrahiranju pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) izkazala za bolj učinkovita od destilirane vode, kar smo dokazali z vsemi metodami vrednotenja ekstraktov.



Slika 44: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih grč (vol. 60 %) petfazne protitočne ekstrakcije.

Ko primerjamo količino ekstrahiranega pinosilvina (PS) v obeh etanolnih topilih (ET50, ET60) opazimo večjo vsebnost PS v topilu ET50 (Slika 42, Slika 44).

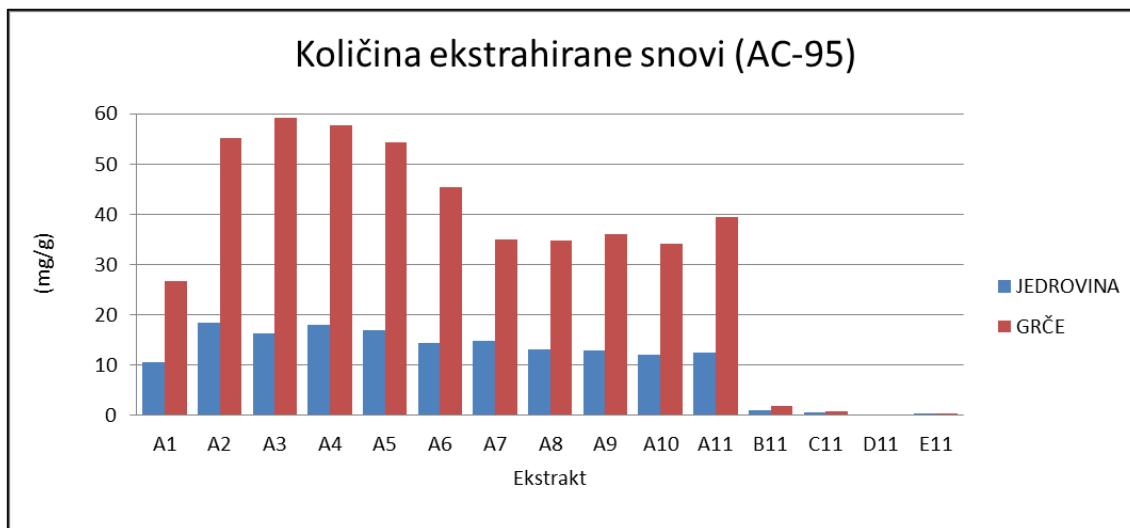


Slika 45: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri etanolnih ekstraktih jedrovine (vol. 60 %) petfazne protitočne ekstrakcije.

Etanol očitno pospeši raztopljanje snovi, kar potrjujejo višje koncentracije ekstrahiranih snovi v obeh etanolnih topilih, kot pri ekstrakciji z vodo. Opazovane komponente so torej lažje topne v etanolu, zato bi pričakovali, da z višim deležem etanola v topilu dosežemo boljšo učinkovitost ekstrakcije. Rezultati analize ekstraktov kažejo nasprotno. Količina ekstrahiranih snovi pri topilu z višjim volumskim deležem etanola (vol. 50 %) je nižja od primerjalnega (vol. 60 %).

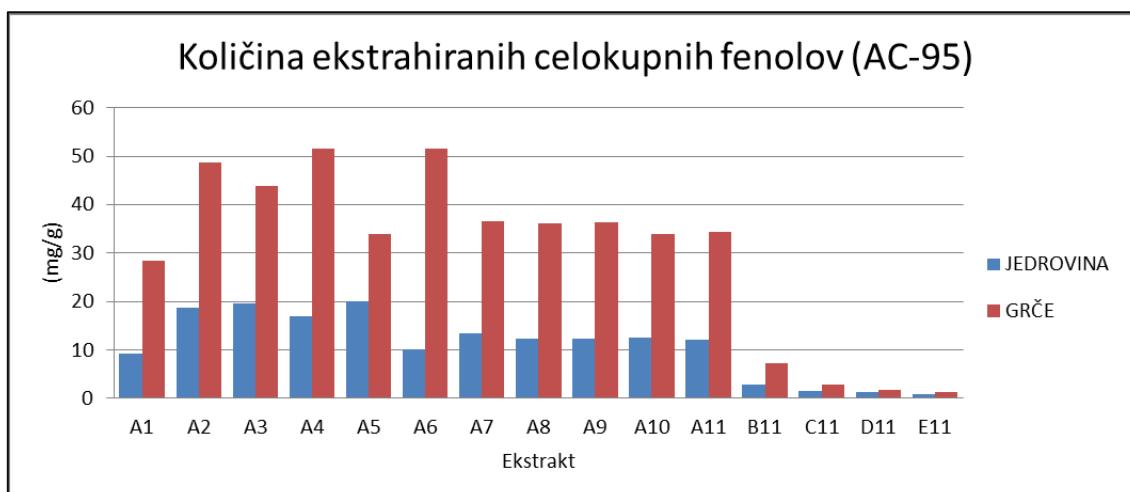
4.3.3 Ekstracijska učinkovitost petfazne protitočne ekstrakcije z vodno raztopino acetona

Acetonski ekstrakti vsebujejo večjo količino ekstrahiranih snovi (Slika 46) od tistih, kjer je bila kot topilo uporabljana destilirana voda (Slika 31). Iz tega lahko sklepamo, da je pri vzorcih žagovine v teh topilih topnih več snovi. Ekstrakti grč vsebujejo približno trikrat več ekstrahirane snovi, kot ekstrakti jedrovine.

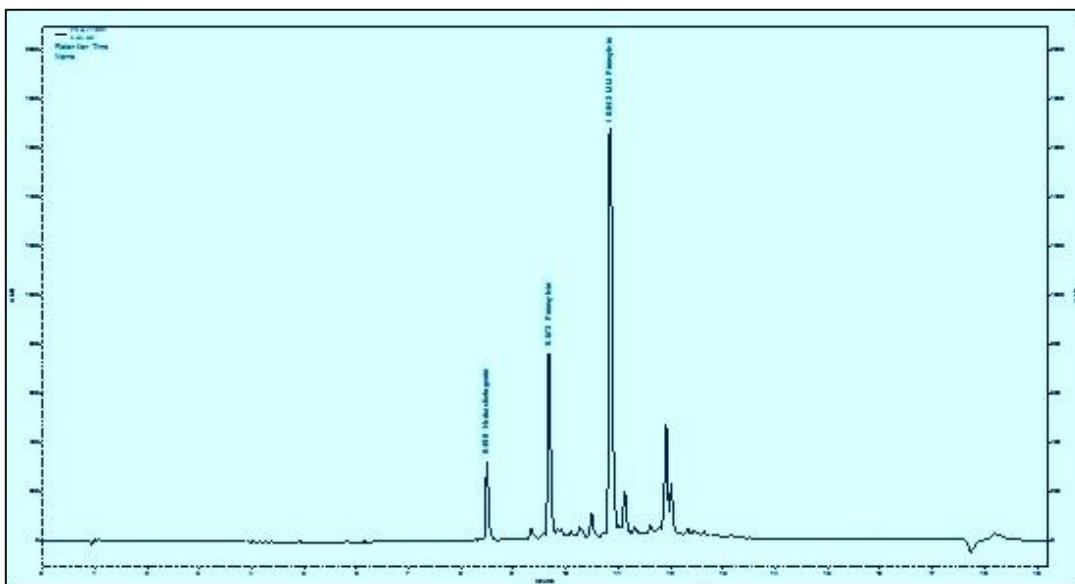


Slika 46: Količina ekstrahirane snovi v acetonskih ekstraktih (vol. 95 %) jedrovine in grč v sistemu petfazne protitočne ekstrakcije. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

Slika 47 prikazuje količino celokupnih fenolov v ekstraktih petfazne protitočne ekstrakcije lesa rdečega bora z acetonskim topilom (aceton/H₂O (95/5 (v/v)). Vsebnost celokupnih fenolov pri ekstraktih grč so pri ostali topilih do dvakrat višje kot pri ekstraktih jedrovine. Pri vseh uporabljenih topilih smo opazili razliko med ekstrahiranimi snovmi iz grč in jedrovine. Vsebnosti celokupnih fenolov pri ekstraktih grč so enkrat višje, kot pri ekstraktih iz jedrovine.



Slika 47: Koncentracija celokupnih fenolov v acetonskih ekstraktih (vol. 95 %) pri petfazni protitočni ekstrakciji. Vrednosti so izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa.

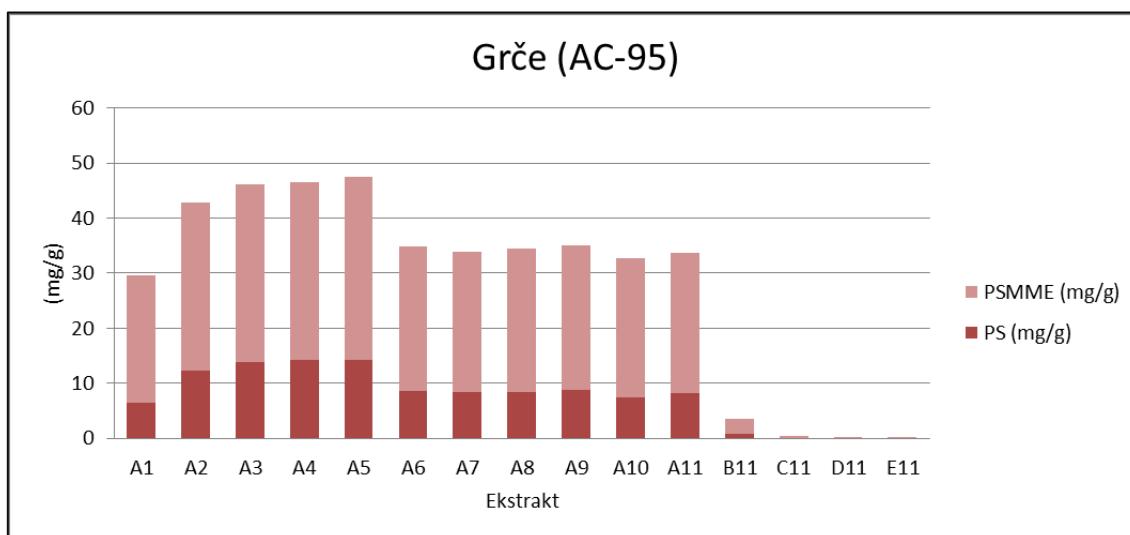


Slika 48: Kromatogram acetonskega ekstrakta grč rdečega bora (GA5-AC95).

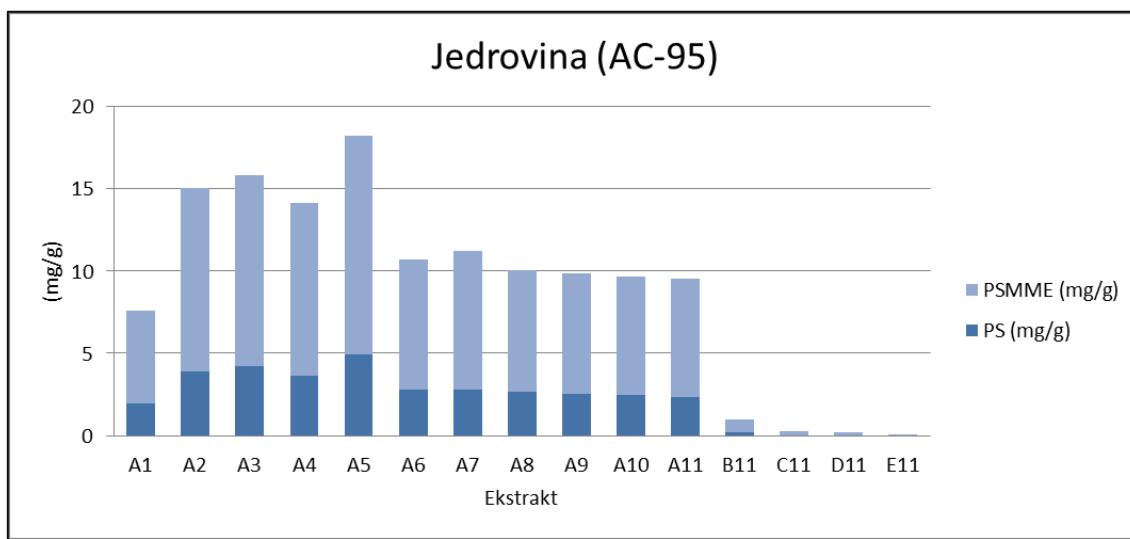
HPLC analiza nam je omogočila dober pogled v kemijsko sestavo ekstraktov (Slika 48).

Določili smo koncentracije pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME).

Na sSlika 49 in Slika 50 so predstavljene količine ekstrahiranega PS in PSMME, izražene v miligramih na gram absolutno suhega lesa. Aceton se je izkazal za učinkovito topilo, saj smo z njim iz vzorcev grč in jedrovine ekstrahirali največ pinosilvinov. Acetonsko topilo že pri enkratnem izpiranju izkaže visoko učinkovitost. Ugotovili smo, da s ponovitvami ekstrakcije (B11-E11) iz vzorcev pridobimo zanemarljivo količino snovi.



Slika 49: Količina ekstrahiranega pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri acetonskih ekstraktih grč (vol. 95 %) v sistemu petfazne protitočne ekstrakcije.



Slika 50: Količina ekstrahiranega pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra pri acetonskih ekstraktih jedrovine (vol. 95 %) petfazne protitočne ekstrakcije.

Iz zgornjih grafičnih prikazov koncentracij snovi v ekstraktih sklepamo, da se snovi v različnih topilih različno raztaplja. Pri vodi je tako hitrost raztapljanja pinosilvinov nizka, medtem ko se pri vzorcih, kjer smo uporabili za topilo etanol ali aceton že v prvem ciklu (A1) izloči večina obravnavanih snovi. Večkratno izpiranje s temi topili ni smiselno in petfazno izpiranje ne kaže opaznega učinka. Medtem pa pri obravnavanju vzorcev z vodo opazimo konstantno naraščanje koncentracije iz cikla v cikel. Vsebnost opazovanih snovi po petkratni protitočni ekstrakciji je v primerjavi z enkratno ekstrakcijo (A1) višja za faktor 1,5.

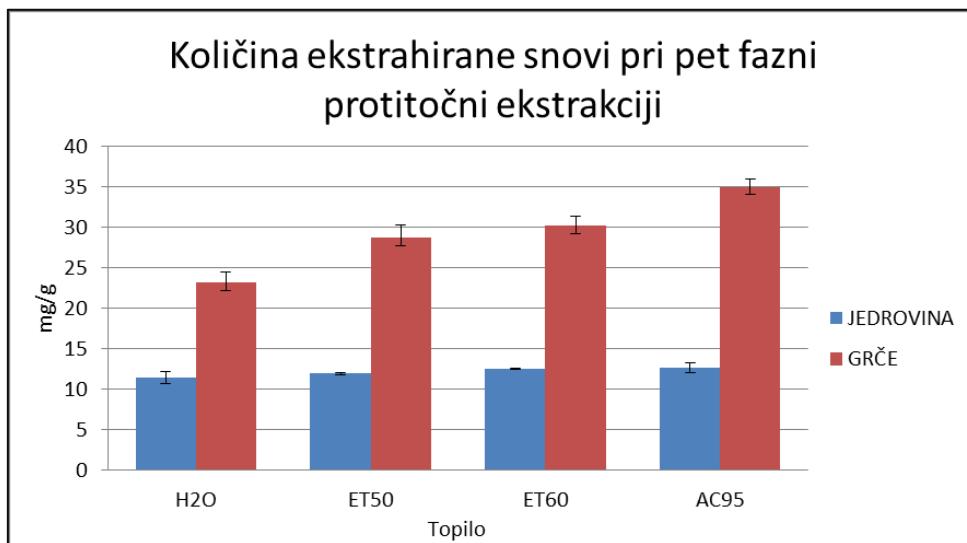
Zelo opazna je razlika med topili, ko opazujemo količino izločenih snovi na gram absolutno suhe žagovine. Acetonski ekstrakti so dosegali do enkrat višje koncentracije pinosilvinov kot vodni ekstrakti.

Na količino pinosilvinov v končnem ekstraktu očitno vpliva tudi uporabljenja surovina. Ekstrakti dobljeni iz grč vsebujejo do trikrat višje koncentracije obravnavanih komponent, kot tisti dobljeni iz jedrovine.

4.4 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI TOPIL V PETFAZNI PROTITOČNI EKSTRAKCIJI

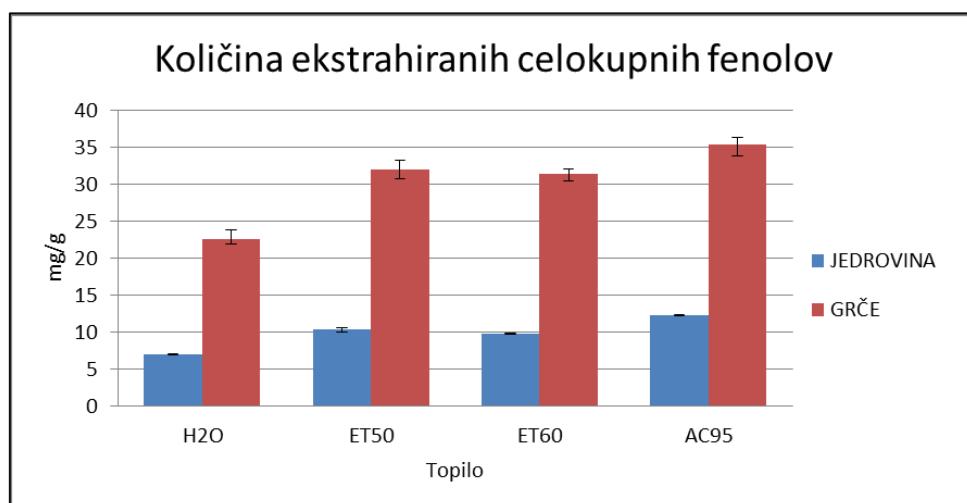
V tem poglavju so predstavljene primerjave povprečnih vrednosti treh produktov petfazne protitočne ekstrakcije. Primerjali smo povprečja ekstrahiranih snovi, dobljenih z uporabo različnih sistemov topil, ločeno za jedrovino in grče. Znano je, da so pinosilvini dobro topni v polarnih topilih. Pinosilvin monometilni eter, ki izkazuje delno nepolaren značaj, se dobro topi tudi v nepolarnih topilih, npr. v cikloheksanu. Zato smo na podlagi izkušenj sodelavcev Delovne skupine za kemijo lesa, kot topila izbrali destilirano vodo, dve vodni raztopni etanola različnih koncentracij in eno vodno raztopino acetona. Pri tem smo želeli ugotoviti, katero topilo je bolj učinkovito in kakšno sestavo ekstrakta dosežemo z njim.

Najprej smo primerjali količine ekstrahiranih snovi, ki smo jih določili gravimetrično. Slika 51 prikazuje primerjavo povprečnih količin ekstrahiranih snovi iz vzorcev jedrovine in grč pri petfazni protitočni ekstrakciji z uporabo različnih sistemov topil. Pri ekstrahiranju jedrovine so vsa topila izkazala primerljivo učinkovitost, saj smo z vodno ekstrakcijo jedrovine pridobili 11,44 mg ekstrahiranih snovi na gram absolutno suhega lesa. Z vodno raztopino acetona pa le nekoliko večjo količino 12,72 mg na gram absolutno suhega lesa. Med tem pri grčah količina ekstrahiranih snovi ni enaka in se razlikuje glede na uporabljeno topilo. Najmanjšo učinkovitost je izkazala destilirana voda, saj smo z destilirano vodo pridobili za tretjino nižje vrednosti kot z vodno raztopino acetona. Kjer smo kot topilo uporabili dve vodni raztopini etanola, je bila količina ekstrahiranih snovi iz grč sicer večja, kot pri vodni ekstrakciji, vendar pa nižja kot pri ekstraktih z vodno raztopino acetona.



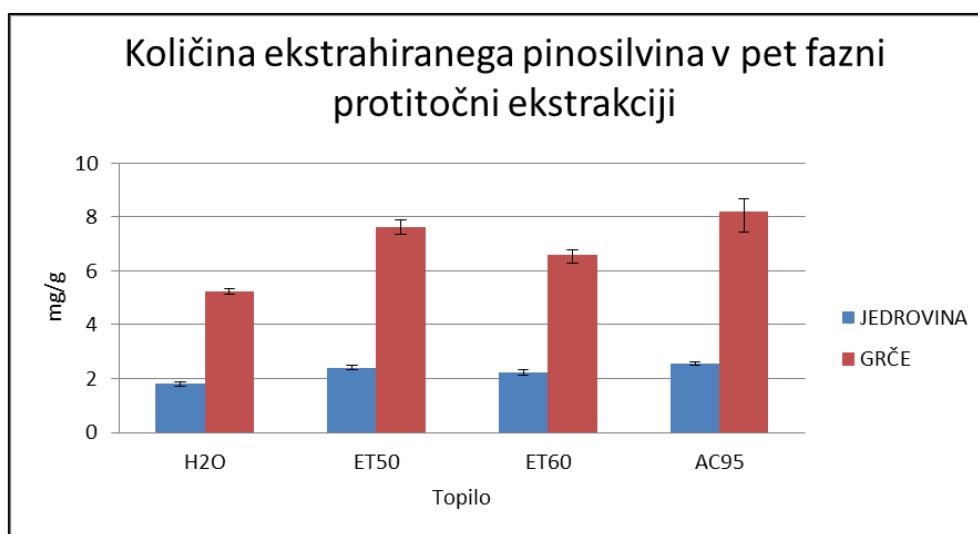
Slika 51: Primerjava ekstrahiranih snovi pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H_2O – dest. H_2O ; ET50, ET60 - etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/ H_2O (95/5 (v/v))).

Iz primerjave povprečnih količin celokupnih fenolov navzočih pri različnih sistemih topil petfazne protitočne ekstrakcije vidimo, da je vodna raztopina acetona najučinkovitejše topilo za izločanje celokupnih fenolov iz lesa. Vodni ekstrakti vsebujejo primerljive količine celokupnih fenolov pri ekstraktih iz jedrovine, med tem ko so razlike pri ekstraktih grč že bolj opazne. Z destilirano vodo smo ekstrahirali 22,68 mg celokupnih fenolov na gram suhega lesa, z acetonom pa 35,47 mg na gram absolutno suhega lesa. Vsebnost celokupnih fenolov v grčah je višja od jedrovine za trikrat.



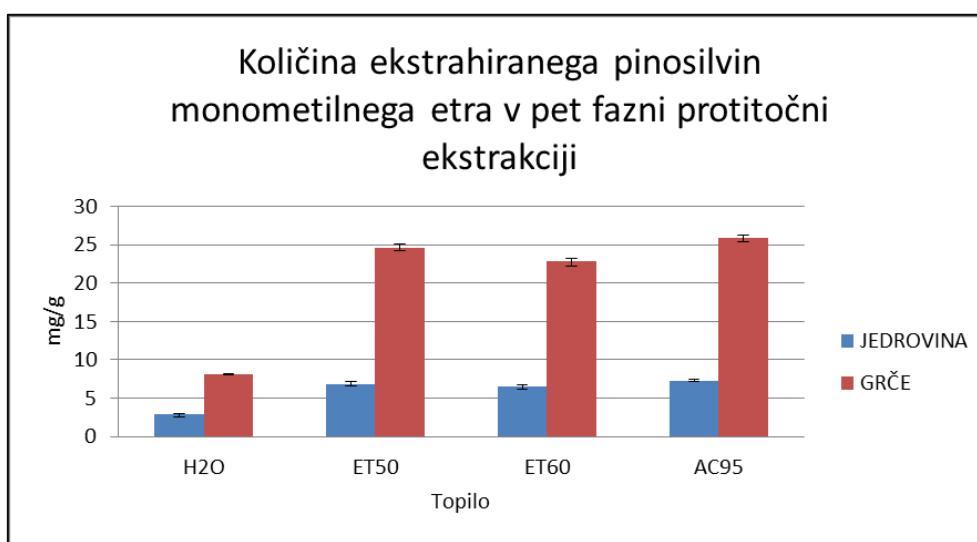
Slika 52: Primerjava količin celokupnih fenolov pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H_2O – dest. H_2O ; ET50, ET60 - etanol/ H_2O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/ H_2O (95/5 (v/v))).

Slika 53 prikazuje primerjavo povprečnih vrednosti pinosilvina v ekstraktih, v miligramih na gram absolutno suhega lesa. Pri ekstrahiranju pinosilvina iz jedrovine rdečega bora so bila topila primerljivo učinkovita, vendar se etanolna in acetonska topila izkažejo za bolj učinkovita. Razlika je še bolj očitna pri ekstrahiranju grč, kjer se pokaže acetonsko topilo za 75 % bolj učinkovito kot destilirana voda. Dobro je vidna razlika v učinkovitosti uporabljenih etanolnih topil (Slika 53). Petfazna protitočna ekstrakcija je 15 % bolj učinkovita pri uporabi topila ET50 (etanol/H₂O 50/50 (v/v)), kot pri ET60 (etanol/H₂O 60/40 (v/v)). Grče vsebujejo več pinosilvina kot jedrovina, pri čemer je količina ekstrahiranih snovi odvisna od topila.



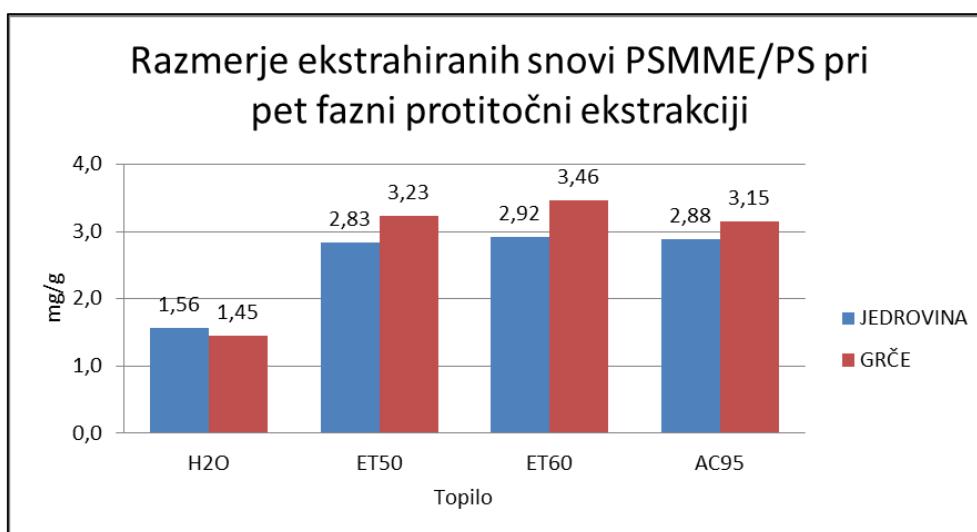
Slika 53: Primerjava količin pinosilvina (PS) pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H₂O – dest. H₂O; ET50, ET60 - etanol/H₂O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - aceton/H₂O (95/5 (v/v))).

Kot prikazuje Slika 54, se učinkovitosti topil pri ekstrahiranju pinosilvin monometilnega etra najbolj razlikujejo. Etanolno topilo (ET50) in acetonsko topilo (AC95) sta se izkazala za najbolj učinkoviti, nekoliko nižje vrednosti je doseglo drugo etanolno topilo (ET60), najnižje vsebnosti PSMME pa vsebujejo vodni ekstrakti. Tako so etanolna in acetonska topila vsaj trikrat učinkovitejša od vode za ekstrakcijo pinosilvin monometilnega etra iz lesa rdečega bora.



Slika 54: Primerjava količin pinosilvin monometilnega etra (PSMME) pri grčah in jedrovini s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H₂O – dest. H₂O; ET50, ET60 - etanol/H₂O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - acetona/H₂O (95/5 (v/v))).

Slika 55 prikazuje razmerje pinosilvin monometilnega etra (PSMME) in pinosilvina (PS) v ekstraktih petfazne protitočne ekstrakcije, za vsa uporabljenata topila. Na podlagi rezultatov sklepamo, da je razmerje PSMME in PS v grčah višje kot v jedrovini. Najnižje razmerje dosega voda, ki je najmanj učinkovito topilo za ekstrahiranje PSMME. Vzrok za to je delno nepolaren značaj PSMME. Razmerje med vsebnostjo PSMME in PS se pri vodnih ekstraktih giblje okoli 1:1,5, pri etanolu in acetonu pa 1:3.

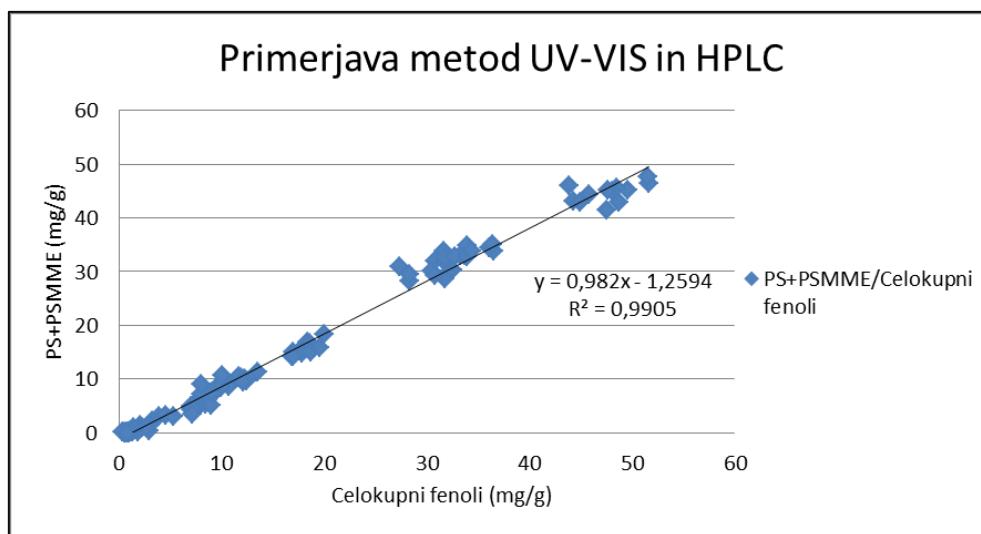


Slika 55: Primerjava razmerij pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME) za grče in jedrovino s petfazno protitočno ekstrakcijo, z uporabo različnih sistemov topil (H₂O – dest. H₂O; ET50, ET60 - etanol/H₂O (50/50, 60/40 (v/v)); AC95 - acetona/H₂O (95/5 (v/v))).

Rezultate smo primerjali z vrednostmi pinosilvina (PS) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME), ki so jih v nekoliko drugačnih pogojih ekstrakcije pridobivali Fang in sod., (2013). V tej raziskavi so iz lesa rdečega bora, ki je rasel na enem od slovenskih rastišč, ekstrahirali pinosilvine s sistemom za pospešeno ekstrakcijo (ASE-Accelerated Solvent Extractor). ASE ekstrakcija je potekala pri povišanem tlaku ($p=13,8$ MPa) in izbrani temperaturi (T), v treh ciklih po 5 min. V omenjeni raziskavi so bila uporabljena enaka topila, kot v našem primeru. Pri ekstrahiranju vzorcev grč z vodo ($T=100$ °C, $p=13,8$ MPa) navajajo primerljivo količino (5,2 mg/g) ekstrahiranega pinosilvina (PS), kot smo ga določili tudi mi pri petfazni protitočni ekstrakciji z vodo (v našem primeru 5,25 mg). Količina ekstrahiranega pinosilvin monometilnega etra (PSMME) s petfazno protitočno ekstrakcijo znaša 8,1 miligrama na gram absolutno suhega lesa, kar je več, kot navajajo Fang in sod. (2013), ki so z vodno ekstrakcijo po ASE postopku ekstrahirali 4,9 miligrama PSMME na gram absolutno suhega lesa. Pri ASE ekstrakciji ($T=120$ °C, $p=13,8$ MPa) z vodno raztopino etanola (vol. 60 %) so iz vzorcev mrtvih grč izločili 46,8 mg PSMME in 23,2 mg PS na gram absolutno suhega lesa. Z uporabo enakega topila smo v pet fazni protitočni ekstrakciji iz grč ekstrahirali nižje koncentracije PSMME (22,83 mg/g) in PS (6,6 mg/g). V vodni raztopini acetona smo s petfazno protitočno ekstrakcijo grč ekstrahirali 25,84 mg PSMME in 8,19 mg PS, na gram absolutno suhega lesa. Fang in sod. (2013) pa so vzorce grč predhodno ekstrahirali s heksanom in tako iz njih dobili 23,2 mg PSMME in 0,1 mg PS. Za tem pa so v vodni raztopini acetona (vol. 95 %) ekstrahirali ($T=100$ °C, $p=13,8$ MPa) še dodatnih 24,1 mg PSMME in 16,2 mg PS na gram absolutno suhega lesa. Razlike v količinah ekstrahiranih snovi pripisujemo različnim ekstrakcijskim metodam in drugačni pripravi materiala.

Za določanje koncentracij snovi v teh ekstraktih petfazne protitočne ekstrakcije smo uporabljali UV-VIS spektrofotometrijo in HPLC analizo. Z velikim številom meritev na istih vzorcih po dveh metodah, bi mogoče lahko preverjali natančnost meritev ali celo zapisali medsebojno odvisnost za ekstrakte lesa bora. Spektroskopska metoda UV-VIS za določanje vsebnosti celokupnih fenolov in HPLC analiza za vrednotenje vsebnosti pinosilvinov sta si po principu delovanja različni, vendar z njima določamo koncentracijo pinosilvinov v ekstraktih. Iz primerjave rezultatov (Slika 56), kjer primerjamo količino celokupnih fenolov in količino pinosilvinov v miligramih na gram absolutno suhega lesa

vidimo, da so v ekstraktih lesa borov prisotni večinoma samo pinosilvini iz skupine fenolnih spojin. V ekstraktih grč bora poleg pinosilvinov ekstrahiramo tudi lignan-nortrahelogenin, vendar je njegova koncentracija nižja od koncentracije omenjenih pinosilvinov.



Slika 56: Zveza med vsebnostjo celokupnih fenolov in vsebnostjo stilbenov (PS+PSMME).

Na Slika 56 smo prikazali zvezo med rezultati UV-VIS metode merjenja vsebnosti celokupnih fenolov in s HPLC analizo izmerjenih koncentracij pinosilvinov. Zelo visok determinacijski koeficient ($R^2 = 0,99$) kaže, da je koncentracijo obeh stilbenov, pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra, mogoče dovolj natančno oceniti že s spektrofotometrično metodo. Menimo, da je mogoče z UV-VIS metodo napovedati okvirne koncentracije stilbenov v ekstraktih iz lesa borov.

5 SKLEPI

- S protitočno ekstrakcijo je mogoče iz lesa rdečega bora učinkovito ekstrahirati pinosilvine.
- Količina ekstrahiranega pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra je odvisna od uporabljenega topila.
- Etanol in aceton pospešita ekstrakcijo in povečata količino ekstrahiranih spojin.
- Aceton se je izkazal za najučinkovitejše topilo za ekstrakcijo pinosilvina (grče 8,19 mg/g, jedrovina 2,45 mg/g) in pinosilvin monometilnega etra (grče 25,84 mg/g, jedrovina 7,31 mg/g).
- Pinosilvin je v vodi dobro topen (5,25 mg/g), ob dodatku ustrezne količine etanola (vol. 50 %) se topnost poveča (7,61 mg/g).
- Pinosilvin monometilni eter je v vodi slabše topen, v kombinaciji z etanolom je topnost boljša, kar pripisujemo delnemu nepolarnemu značaju molekule.
- Ugotovljena je tesna zveza med vsebnostjo fenolov in količino pinosilvinov v lesu rdečega bora ($Y=0,982X-0,2594$; $R^2=0,9905$). S spektrofotometrično analizo celokupnih fenolov lahko napovemo količino pinosilvinov v ekstraktih borov.
- Količina pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra je v grčah trikrat višja kot v jedrovini.
- Razmerje med ekstrahiranim pinosilvinom in pinosilvin monometilnim etrom je pri vodnih ekstraktih okoli 1:1,5 pri etanolnih in acetonskih ekstraktih pa 1:3.
- Razmerje pinosilvina in pinosilvin monometilnega etra je v grčah drugačno, kot v jedrovini, v grčah je 10 - 15 % več pinosilvin monometilnega etra na isto količino pinosilvina.
- Petfazna protitočna ekstrakcija je primerna za ekstrahiranje pinosilvinov z destilirano vodo, saj se količina izločenih snovi poviša za polovico glede na enkratno ekstrakcijo.
- Več fazno protitočno ekstrahiranje vzorcev lesa z etanolnimi in acetonskimi topili ni smiselno, saj ob zadostni količini topila že pri enkratnem spiranju dosežemo visoko učinkovitost ekstrakcije.

6 POVZETEK

Pinosilvini so predstavniki stilbenov, za katere velja, da so bioaktivne spojine v lesu. Pinosilvin (PS) in pinosilvin monometilni eter (PSMME) se pojavljata le v rodu borov (*Pinus*). Omenjeni spojini predstavljata ekstraktibilne snovi v grčah in jedrovini lesa rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.). Rdeči bor je pri nas najbolj razširjena vrsta bora, v slovenski gozdovih predstavlja 4,9 % skupne lesne mase. V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti, ali je protitočna ekstrakcija primerna za izločanje pinosilvinov iz lesa rdečega bora. Za ekstrakcijo pinosilvinov se najpogosteje uporablajo različna polarna topila. Fang in sod. (2013) so prišli do ugotovitev, da z vročo vodo in vodno etanolnimi raztopinami iz lesa bora lahko pridobimo primerne snovi za prehranske izdelke.

Najprej smo izvedli osemfazno protitočno ekstrakcijo lesa rdečega bora, kjer smo za topilo uporabili destilirano vodo. Na podlagi analiz produktov preliminarne poskusa smo se odločili za petfazno protitočno ekstrakcijo. V sistemu petfazne protitočne ekstrakcije smo grče in jedrovino rdečega bora ekstrahirali s tremi različnimi sistemi topil. Za topilo smo uporabili destilirano vodo, dve vodni raztopini etanol/H₂O (50/50, 60/40 (v/v)) ter vodno raztopino aceton/H₂O (95/5 (v/v)). Produkte petfazne protitočne ekstrakcije smo analizirali in jim izmerili vsebnosti celokupnih fenolov s pomočjo UV-VIS absorpcijske spektrofotometrije. S HPLC analizo smo določili koncentraciji PS in PSMME, gravimetrično pa smo določili celokupno količino ekstrahiranih snovi. Z vsemi uporabljenimi topili smo po postopku petfazne protitočne ekstrakcije iz lesa rdečega bora uspešno izločili PS in PSMME. Kot navajajo že Willför in Hemming (2003) sta PS in PSMME v grčah prisotna v večjih količinah kot v jedrovini, v našem primeru smo ekstrahirali do trikrat več snovi iz grč kot iz jedrovine. V nadaljevanju smo primerjali učinkovitost uporabljenih topil v sistemu petfazne protitočne ekstrakcije. Z dodajanjem etanola in acetona destilirani vodi povečamo učinkovitost ekstrakcije za PS in PSMME. Aceton se je izkazal za najučinkovitejše topilo za ekstrakcijo pinosilvina (grče 8,19 mg/g, jedrovina 2,45 mg/g) in pinosilvin monometilnega etra (grče 25,84 mg/g, jedrovina 7,31 mg/g). Petfazna protitočna ekstrakcija je primerna metoda za ekstrahiranje pinosilvinov z destilirano vodo, saj se količina izločenih snovi poviša za polovico glede na enkratno ekstrakcijo.

7 VIRI

Arsenault J.C., McDonald P.D. 2007. Beginners guide to liquid chromatography. Milford, USA, Waters Corporation: 52 str.

Bamber R.K. 1961. Seapwood and heartwood. V: Forestry commision of New South Wales, number 2

Bergström B. 2003. Chemical and structural changes during heartwood formation in *Pinus sylvestris*. Forestry, 76: 45-53

Brus R. 2008. Dendrologija za gozdarje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo: 408 str.

Celimene C.C., Micales J.A., Ferge L., Young R.A. 1999. Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. Holzforschung, 53: 491-497

Čufar K. 2006. Anatomija lesa. Univerzitetni učbenik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 185 str.

DMT 2010.

<https://www.dmt-nexus.me/forum/default.aspx?g=posts&t=18190> (6.9.2014)

Fang W., Hemming J., Reunanen M., Eklund P., Conde P. E., Poljanšek I., Oven P., Willför S. 2013. Evaluation of selective extraction methods for recovery of polyphenols from pine. Holzforschung, 67, 8: 843-81

Gea Finland 2014.

<http://www.gea-pe.fi/NFI/cmsdoc.nsf/webdoc/ndkw73gh4q> (6.9.2014).

Gorham J. 1995. The biochemistry of the stilbenoids. London, Chapman & Hall: 262 str.

Green D.W., Winandy J.E., Kretschmann D.E. 1999. Mechanical properties of wood. V: Wood handbook, chapter 4, Medison forest product laboratory

Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D.Y. 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trst, International centre for science and high technology: 266 str.

Hillis W.E. 1887. Heartwood and tree exudates. Berlin, Springer-Verlag: 268 str.

Jensen W. B. 2007. The origin of the Soxhlet extractor. Journal of Chemical Education (ACS), 84, 12: 1913-1914

Micro-Forum 2010

<http://www.mikroskopie-forum.de/index.php?topic=6413.0> (6.9.2014).

Oven P. 2013. Spojine v lesu kot proizvodi z visoko dodano vrednostjo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Pereira H., Graca J., Rodrigues J. 2003. Wood chemistry in relation to quality. V: Wood quality and its biological basis. Oxford Blackwell Publishing UK, Barnett J.R., Jeronimidis G: 226 str.

Royal society of chemistry 2007

<http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2007/September/ClassicKitSoxhletExtractor.asp> (6.9.2014)

Shigo A. 1985. How tree branches are attached to trunks. Canadian journal of botany, 63, 8: 1391-1401

Silva F., Figueiras A., Gallardo E., Nerin C., Domingues F.C. 2014. Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: A comparative study between cyclodextrins and bile acids. Food Chem., 145: 115-125

Sjöström E. 1993. Wood chemistry: Fundamentals and Applications. San Diego, Academic Press UK. Chapter 5: 293 str.

Smith A.L., Campbell C.L., Walker D.B., Hanover J.W. 1989. Extracts from black locust as wood preservatives. Holzforschung, 43: 293-96

Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. 2010. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition. Hoboken, New Jersey, USA, Wiley & Sons, Inc.: 960 str.

Taylor A., Gartner B., Morrell J. 2002. Heartwood formation and natural durability a review. Wood and fiber science, 34, 4: 587-611

Thermo Scientific. 2012. Accucore HPLC columns. Core enhanced technology, <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Catalogs%20&%20Brochures/Chromatography/GC%20HPLC%20and%20UHPLC%20Columns%20and%20Accessories/HPLC%20Columns/TG-20666-Accucore-HPLC-Columns-TG20666-EN.pdf> (22. okt. 2014)

Tišler V., Lipusek I. 2001. Toksične snovi v lesovih. Les, 53, 5: 148-158

Torelli N. 1990. Les in skorja. Slovar strokovnih izrazov. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 70 str.

Vek V. 2013. Ekstraktivi v poškodovanem lesu in grčah navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.). Dokt. disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 162 str.

Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J. 2010. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Boca Raton - London - New York, CRC Press, Taylor & Francis Group: 995 str.

Waters 2014

http://www.waters.com/waters/en_SI/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055 (1.12.2014)

Willför S., Hemming J. 2003. Phenolic and lipophilic extractives in scots pine knots and stemwood. *Holzforschung*, 57, 359-72

Woodworker 2004

<http://www.americanwoodworker.com/blogs/techniques/archive/2010/01/08/knots.aspx> (6.9.2014).

Yang G., Jaakkola P. 2012. Research work on extractives from wood. <http://biotulihanke.fi/files/download/BIOTULIResearchWorkonExtractivesfromWood2012.pdf> (6.9.2014)

Zavod za gozdove Slovenije 2005

<http://www.zgs.si/slo/gozdovi-slovenije/o-gozdovih-slovenije/karte/index.html> (19.11.2014)

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, Samozaložba: 154 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Idi Poljanšek in somentorju prof. dr. Primožu Ovnu za nasvete in usmerjanje pri laboratorijskem delu in pomoč pri oblikovanju magistrskega dela.

Velika zahvala gre tudi sodelavcem Delovne skupine za kemijo lesa, Marku Željku in Vilijem Veku za strokovno pomoč pri delu v laboratoriju in na terenu.

Na koncu pa gre zahvala mojim naj bližnjim, ki me podpirajo in so mi to omogočili.

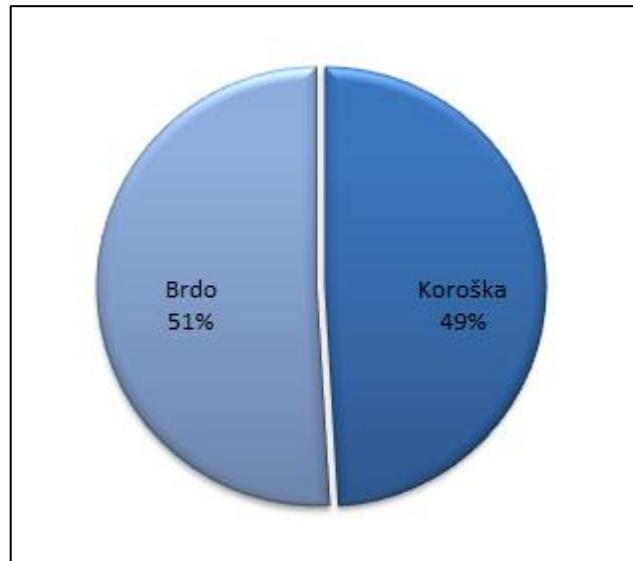
Hvala!

PRILOGE

PRILOGA 1:

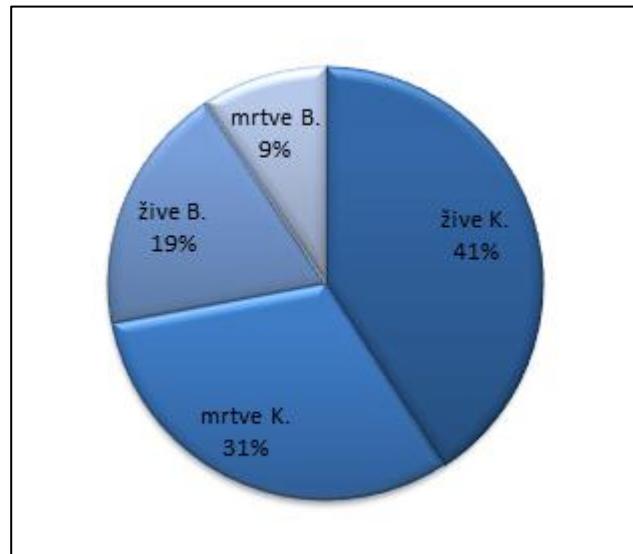
- Sestava industrijskega vzorca jedrovine:

MASA (g)		
	Koroška (K)	Brdo (B)
	1479	1537
%	49	51
Σ	3016	



- Sestava industrijskega vzorca grč:

MASA (g)				
	Koroška (K)		Brdo (B)	
	Žive	Mrtve	Žive	Mrtve
	1374	1050	629	312
%	40,8	31,2	18,7	9,3
Σ	3365,7			



PRILOGA 2:

- Suha snov vzorca

VZOREC	MASA TEHTIČA (m ₁) [g]	MASA VZORCA (m ₂) [g]	MASA TEHTIČA Z VZORCEM PO SUŠENJU (m ₃) [g]
PSB-133-J2-	29,4291	1,00141	30,44231
GRČE	28,18659	1,00097	29,10784
JEDROVINA	34,5778	1,00021	35,50025

PRILOGA 3:

- Vrednost suhega ostanka pri osemfazni protitočni vodni ekstrakciji PSB-133-J2-

VZOREC	TARA (m_1) [g]	SKUPAJ (m_2) [g]	SUHI OSTANEK (mg/l)	SUHI OSTANEK (mg/g)
A1	17,77174	17,77648	47,4	11,94
A2	20,30223	20,31013	79,0	19,91
A3	17,99118	18,00235	111,7	28,15
A4	17,89602	17,90754	115,2	29,03
A5	17,94255	17,95288	103,3	26,03
A6	18,03882	18,051	121,8	30,69
A7	17,99238	18,00485	124,7	31,42
A8	19,87811	19,89093	128,2	32,31
A9	17,89152	17,90217	106,5	26,84
A10	20,38559	20,39694	113,5	28,60
B10	19,76567	19,77228	66,1	16,66
C10	20,37688	20,38197	50,9	12,83
Č10	17,96002	17,96391	38,9	9,80
D10	21,08095	21,08387	29,2	7,36
E10	20,5127	20,51474	20,4	5,14
F10	20,96583	20,96738	15,5	3,91
G10	21,31644	21,31736	9,2	2,32

- Vrednosti suhega ostanka pri petfazni protitočni vodni ekstrakciji:

VZOREC		TARA (m_1) [g]	SKUPAJ (m_2) [g]	SUHI OSTANEK (mg/l)	SUHI OSTANEK (mg/g)
A1	GRČE	19,79973	19,80698	145,00	15,75
	JEDROVINA	19,83598	19,83962	72,80	7,91
A2	GRČE	19,99378	20,00655	255,40	27,75
	JEDROVINA	19,97777	19,98439	132,40	14,39
A3	GRČE	20,15935	20,17241	261,20	28,38
	JEDROVINA	19,94427	19,95143	143,20	15,56
A4	GRČE	20,37679	20,39121	288,40	31,34
	JEDROVINA	20,0966	20,10423	152,60	16,58
A5	GRČE	20,37698	20,39164	293,20	31,86
	JEDROVINA	19,96288	19,96978	138,00	14,99
A6	GRČE	20,30213	20,31301	217,60	23,64
	JEDROVINA	19,9767	19,98248	115,60	12,56
A7	GRČE	19,70729	19,71777	209,60	22,77
	JEDROVINA	20,1998	20,20563	116,60	12,67
A8	GRČE	20,23371	20,24375	200,80	21,82
	JEDROVINA	19,51169	19,51732	112,60	12,23
A9	GRČE	19,21261	19,22386	225,00	24,45
	JEDROVINA	20,40518	20,41039	104,20	11,32
A10	GRČE	20,03097	20,04166	213,80	23,23
	JEDROVINA	20,43627	20,44122	99,00	10,76
A11	GRČE	19,84517	19,85521	200,80	21,82
	JEDROVINA	20,31416	20,31919	100,60	10,93
B11	GRČE	20,5088	20,5135	94,00	10,21
	JEDROVINA	20,44188	20,44383	39,00	4,24
C11	GRČE	20,05321	20,05605	56,80	6,17
	JEDROVINA	20,22756	20,22909	30,60	3,32
D11	GRČE	17,73963	17,74159	39,20	4,26
	JEDROVINA	19,54082	19,54172	18,00	1,96
E11	GRČE	19,75415	19,75505	18,00	1,96
	JEDROVINA	19,69021	19,69069	9,60	1,04

- Vrednosti suhega ostanka pri petfazni protitočni etanolni ekstrakciji (50 %):

VZOREC		TARA (m_1) [g]	SKUPAJ (m_2) [g]	SUHI OSTANEK (mg/l)	SUHI OSTANEK (mg/g)
A1	GRČE	20,05833	20,08308	247,50	26,89
	JEDROVINA	20,38503	20,39497	99,40	10,80
A2	GRČE	21,16643	21,2116	451,70	49,08
	JEDROVINA	21,1564	21,17605	196,50	21,35
A3	GRČE	19,87775	19,91991	421,60	45,81
	JEDROVINA	21,10747	21,12766	201,90	21,94
A4	GRČE	19,59727	19,63636	390,90	42,47
	JEDROVINA	20,10131	20,12119	198,80	21,60
A5	GRČE	19,89116	19,93015	389,90	42,36
	JEDROVINA	21,65851	21,67849	199,80	21,71
A6	GRČE	19,96563	19,9963	306,70	33,32
	JEDROVINA	18,0682	18,08019	119,90	13,03
A7	GRČE	17,5583	17,5926	343,00	37,27
	JEDROVINA	20,82801	20,84117	131,60	14,30
A8	GRČE	21,14312	21,1682	250,80	27,25
	JEDROVINA	21,14407	21,15519	111,20	12,08
A9	GRČE	20,07402	20,1002	261,80	28,45
	JEDROVINA	21,1707	21,18153	108,30	11,77
A10	GRČE	19,76509	19,7932	281,10	30,54
	JEDROVINA	17,7841	17,79511	110,10	11,96
A11	GRČE	20,16824	20,19647	282,30	30,67
	JEDROVINA	21,13011	21,13937	92,60	10,06
B11	GRČE	20,26568	20,26892	32,40	3,52
	JEDROVINA	20,54605	20,5475	14,50	1,58
C11	GRČE	20,94132	20,94249	11,70	1,27
	JEDROVINA	21,41835	21,419	6,50	0,71
D11	GRČE	21,91164	21,91193	2,90	0,32
	JEDROVINA	17,78337	17,7836	2,30	0,25
E11	GRČE	21,31658	21,31741	8,30	0,90
	JEDROVINA	20,64676	20,6472	4,40	0,48

- Vrednosti suhega ostanka pri petfazni protitočni etanolni ekstrakciji (60 %):

VZOREC		TARA (m_1) [g]	SKUPAJ (m_2) [g]	SUHI OSTANEK (mg/l)	SUHI OSTANEK (mg/g)
A1	GRČE	17,44266	17,46784	251,80	27,36
	JEDROVINA	17,75699	17,76655	95,60	10,39
A2	GRČE	21,07753	21,12839	508,60	55,26
	JEDROVINA	21,47478	21,4955	207,20	22,51
A3	GRČE	20,18227	20,23367	514,00	55,85
	JEDROVINA	17,9813	17,99861	173,10	18,81
A4	GRČE	20,9724	21,02521	528,10	57,38
	JEDROVINA	17,83482	17,85204	172,20	18,71
A5	GRČE	20,51296	20,56522	522,60	56,78
	JEDROVINA	18,13937	18,15496	155,90	16,94
A6	GRČE	17,88445	17,91323	287,80	31,27
	JEDROVINA	20,64908	20,65998	109,00	11,84
A7	GRČE	18,12618	18,15399	278,10	30,22
	JEDROVINA	20,0928	20,10474	119,40	12,97
A8	GRČE	21,73087	21,75813	272,60	29,62
	JEDROVINA	18,52012	18,53153	114,10	12,40
A9	GRČE	20,85121	20,88064	294,30	31,98
	JEDROVINA	20,32354	20,33507	115,30	12,53
A10	GRČE	19,705	19,73186	268,60	29,18
	JEDROVINA	17,52988	17,54144	115,60	12,56
A11	GRČE	20,43076	20,4575	267,40	29,05
	JEDROVINA	19,89729	19,90859	113,00	12,28
B11	GRČE	19,94246	19,94428	18,20	1,98
	JEDROVINA	20,27737	20,27865	12,80	1,39
C11	GRČE	19,97824	19,97888	6,40	0,70
	JEDROVINA	21,36501	21,36526	2,50	0,27
D11	GRČE	20,49396	20,49429	3,30	0,36
	JEDROVINA	20,13559	20,13612	5,30	0,58
E11	GRČE	20,25043	20,25107	6,40	0,70
	JEDROVINA	20,54688	20,54767	7,90	0,86

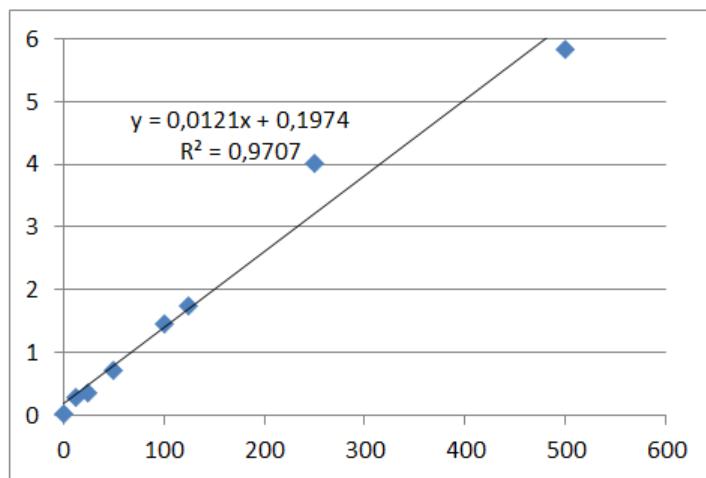
- Vrednosti suhega ostanka pri petfazni protitočni acetonski ekstrakciji (95 %):

VZOREC		TARA (m_1) [g]	SKUPAJ (m_2) [g]	SUHI OSTANEK (mg/l)	SUHI OSTANEK (mg/g)
A1	GRČE	20,23349	20,25812	246,30	26,76
	JEDROVINA	21,61454	21,62435	98,10	10,66
A2	GRČE	19,68942	19,7402	507,80	55,17
	JEDROVINA	22,01503	22,03193	169,00	18,36
A3	GRČE	19,99544	20,04988	544,40	59,15
	JEDROVINA	21,1798	21,19488	150,80	16,38
A4	GRČE	20,48024	20,53338	531,40	57,74
	JEDROVINA	19,79482	19,8114	165,80	18,01
A5	GRČE	20,12639	20,17637	499,80	54,30
	JEDROVINA	20,31335	20,32896	156,10	16,96
A6	GRČE	19,85563	19,89744	418,10	45,43
	JEDROVINA	17,98648	17,99974	132,60	14,41
A7	GRČE	21,33981	21,37204	322,30	35,02
	JEDROVINA	20,23632	20,24994	136,20	14,80
A8	GRČE	21,04094	21,07304	321,00	34,88
	JEDROVINA	20,29126	20,30344	121,80	13,23
A9	GRČE	21,52852	21,56169	331,70	36,04
	JEDROVINA	20,23214	20,24402	118,80	12,91
A10	GRČE	17,9603	17,99167	313,70	34,08
	JEDROVINA	19,64566	19,65671	110,50	12,01
A11	GRČE	21,60987	21,6461	362,30	39,37
	JEDROVINA	20,34557	20,35705	114,80	12,47
B11	GRČE	17,55934	17,56115	18,10	1,97
	JEDROVINA	19,86249	19,86338	8,90	0,97
C11	GRČE	21,1265	21,1273	8,00	0,87
	JEDROVINA	17,98547	17,986	5,30	0,58
D11	GRČE	21,95977	21,95982	0,50	0,05
	JEDROVINA	19,96669	19,96692	2,30	0,25
E11	GRČE	20,87481	20,87523	4,20	0,46
	JEDROVINA	20,31289	20,3132	3,10	0,34

PRILOGA 4:

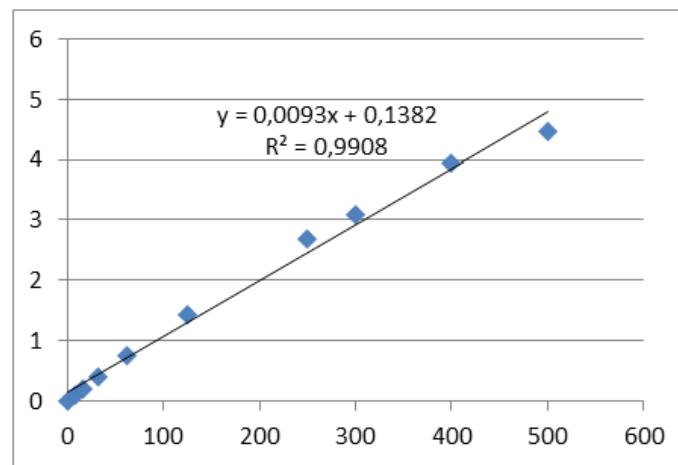
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (PSB-133-J2, H₂O):

(PSB-133-J2-) H ₂ O	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0181
12,5	0,2758
25	0,3593
50	0,7094
100	1,451
125	1,737
250	4,0205
500	5,8273



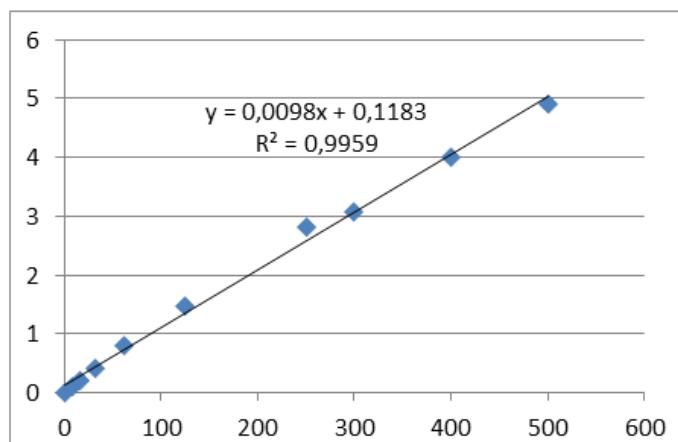
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (grče, H₂O):

GRČE (H ₂ O)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0082
7,8	0,1070
15,6	0,2092
31,25	0,3979
62,5	0,7652
125	1,4260
250	2,6841
300	3,0857
400	3,9430
500	4,4650



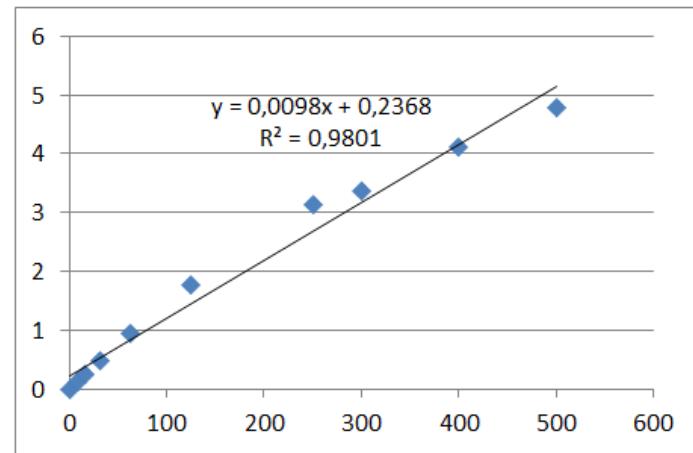
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (jedrovina, H₂O):

JEDROVINA (H ₂ O)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0061
7,8	0,1057
15,6	0,2122
31,25	0,4115
62,5	0,7972
125	1,4838
250	2,8108
300	3,0871
400	3,9937
500	4,9164



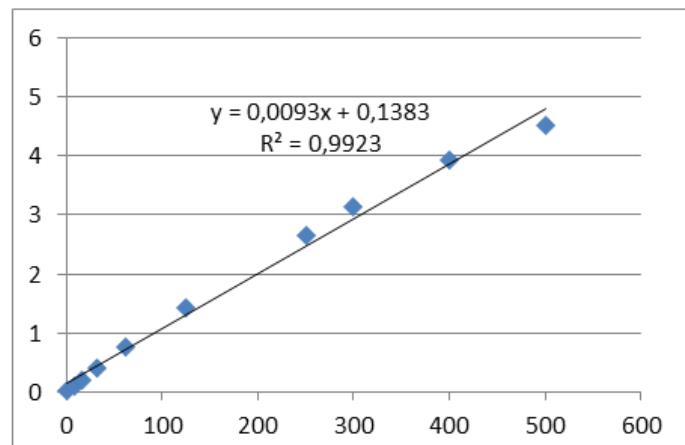
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (grče, ET-50):

GRČE	
Etanol:H ₂ O (50:50)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0084
7,8	0,1193
15,6	0,2576
31,25	0,4907
62,5	0,9523
125	1,7630
250	3,1490
300	3,3775
400	4,1032
500	4,7954



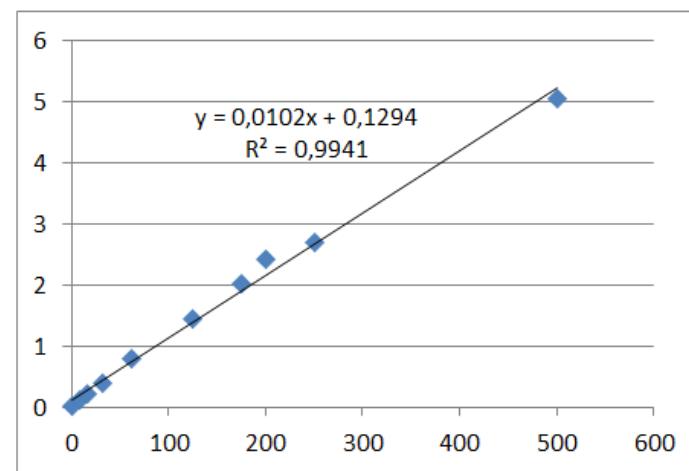
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (jedrovina, ET-50):

JEDROVINA	
Etanol:H ₂ O (50:50)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0124
7,8	0,1116
15,6	0,2131
31,25	0,4068
62,5	0,768
125	1,4311
250	2,64
300	3,1328
400	3,921
500	4,5166



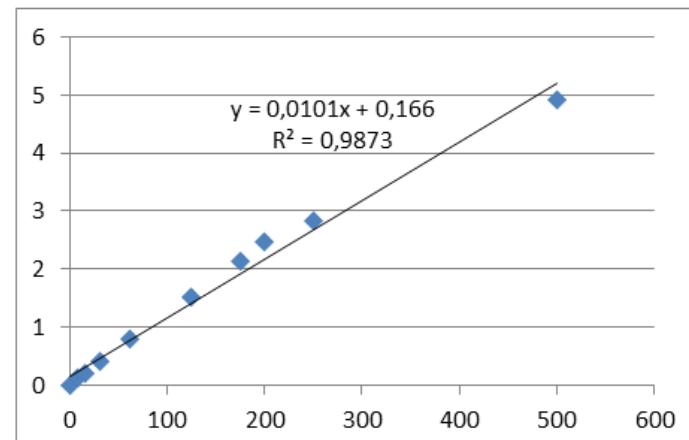
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (grče, ET-60):

GRČE	
Etanol:H ₂ O (60:40)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0280
7,8	0,1189
15,6	0,2219
31,25	0,3973
62,5	0,7879
125	1,4572
250	2,7026
300	2,0175
400	2,4161
500	5,0484



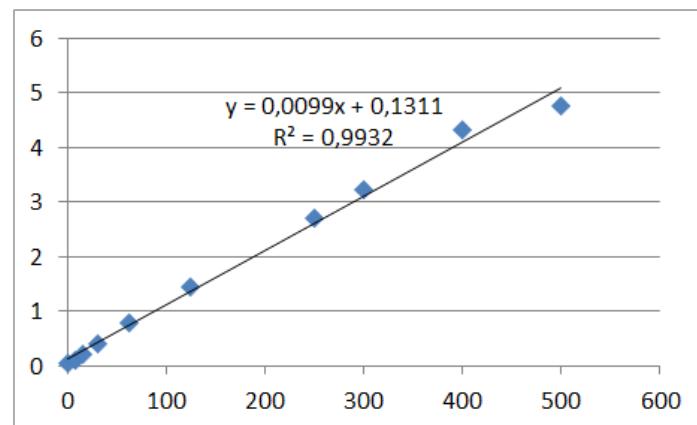
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (jedrovina, ET-60):

JEDROVINA	
Etanol:H ₂ O (60:40)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0091
7,8	0,1252
15,6	0,2158
31,25	0,4044
62,5	0,7988
125	1,516
250	2,8204
300	2,1286
400	2,4646
500	4,9227



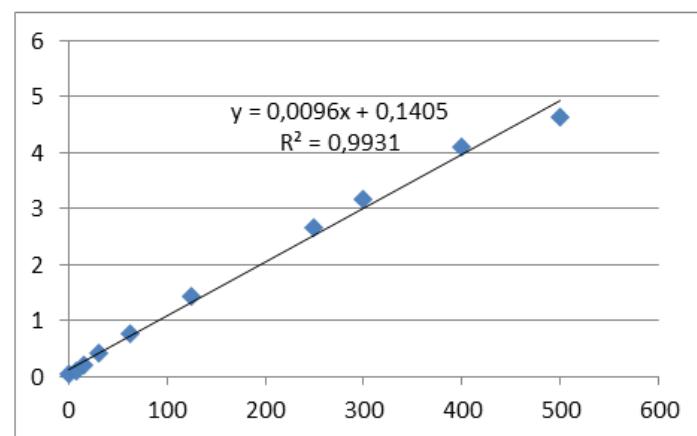
- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (grče, AC-95):

GRČE	
Aceton:H ₂ O (95:5)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0622
7,8	0,1180
15,6	0,2225
31,25	0,4198
62,5	0,7867
125	1,4553
250	2,7141
300	3,2373
400	4,3138
500	4,7719



- Umeritvena premica za določanje vsebnosti celokupnih fenolov (jedrovina, AC-95):

JEDROVINA	
Aceton:H ₂ O (95:5)	
Koncentracija [g/l]	Absorbanca (A ₇₆₅)
0	0,0596
7,8	0,1162
15,6	0,2187
31,25	0,4142
62,5	0,7771
125	1,4432
250	2,654
300	3,1827
400	4,108
500	4,6236



PRILOGA 5:

- Vsebnost celokupnih fenolov PSB-133-J2-:

VZOREC	PROSOJNOST (765 nm)	KONCENTRACIJA (mg/L)	CELOKUPNI FENOLI (mg/g)
A1	0,586	47,45	11,95586
A2	0,8705	78,37	19,7484
A3	1,1672	110,62	27,8751
A4	1,202	114,40	28,82829
A5	1,2498	119,60	30,13754
A6	1,2136	115,66	29,14601
A7	1,2458	119,16	30,02798
A8	1,212	115,49	29,10219
A9	1,1754	111,51	28,09971
A10	1,1458	108,29	27,28895
B10	0,8307	74,04	18,65827
C10	0,682	57,88	14,58533
C10	0,506	38,75	9,764641
D10	0,4186	29,25	7,370729
E10	0,3237	18,93	4,77139
F10	0,2376	9,58	2,413085
G10	0,148	-0,16	-0,04109

- Vsebnost celokupnih fenolov vodne ekstrakcije:

VZOREC		CELOKUPNI FENOLI (mg/L)	CELOKUPNI FENOLI (mg/g)
A1	GRČE	147,91	16,08
	JEDROVINA	36,13	3,92
A2	GRČE	244,24	26,55
	JEDROVINA	67,88	7,36
A3	GRČE	258,87	28,14
	JEDROVINA	75,26	8,16
A4	GRČE	271,37	29,50
	JEDROVINA	78,45	8,51
A5	GRČE	283,31	30,79
	JEDROVINA	83,03	9,01
A6	GRČE	220,22	23,94
	JEDROVINA	69,51	7,54
A7	GRČE	219,99	23,91
	JEDROVINA	70,04	7,60
A8	GRČE	219,48	23,86
	JEDROVINA	65,05	7,06
A9	GRČE	204,28	22,20
	JEDROVINA	64,81	7,03
A10	GRČE	202,15	21,97
	JEDROVINA	65,02	7,05
A11	GRČE	191,96	20,87
	JEDROVINA	65,93	7,15
B11	GRČE	101,03	10,98
	JEDROVINA	42,55	4,62
C11	GRČE	66,50	7,23
	JEDROVINA	30,61	3,32
D11	GRČE	51,60	5,61
	JEDROVINA	19,26	2,09
E11	GRČE	32,80	3,56
	JEDROVINA	13,17	1,43

- Vsebnost celokupnih fenolov etanolne ekstrakcije (50 %):

VZOREC		CELOKUPNI FENOLI (mg/L)	CELOKUPNI FENOLI (mg/g)
A1	GRČE	299,45	32,55
	JEDROVINA	87,50	9,49
A2	GRČE	456,45	49,61
	JEDROVINA	169,25	18,36
A3	GRČE	446,29	48,51
	JEDROVINA	170,12	18,45
A4	GRČE	441,91	48,03
	JEDROVINA	171,16	18,56
A5	GRČE	438,15	47,62
	JEDROVINA	123,72	13,42
A6	GRČE	310,66	33,77
	JEDROVINA	109,99	11,93
A7	GRČE	291,63	31,70
	JEDROVINA	107,68	11,68
A8	GRČE	283,61	30,83
	JEDROVINA	97,51	10,58
A9	GRČE	292,40	31,78
	JEDROVINA	95,61	10,37
A10	GRČE	305,86	33,25
	JEDROVINA	93,27	10,12
A11	GRČE	292,40	31,78
	JEDROVINA	94,46	10,25
B11	GRČE	48,85	5,31
	JEDROVINA	19,18	2,08
C11	GRČE	20,92	2,27
	JEDROVINA	9,13	0,99
D11	GRČE	7,92	0,86
	JEDROVINA	5,38	0,58
E11	GRČE	6,74	0,73
	JEDROVINA	3,85	0,42

- Vsebnost celokupnih fenolov etanolne ekstrakcije (60 %):

VZOREC		CELOKUPNI FENOLI (mg/L)	CELOKUPNI FENOLI (mg/g)
A1	GRČE	260,58	28,32
	JEDROVINA	74,14	8,04
A2	GRČE	407,92	44,34
	JEDROVINA	157,04	17,03
A3	GRČE	437,37	47,54
	JEDROVINA	156,09	16,93
A4	GRČE	421,86	45,85
	JEDROVINA	162,41	17,62
A5	GRČE	413,07	44,90
	JEDROVINA	164,53	17,85
A6	GRČE	251,71	27,36
	JEDROVINA	74,25	8,05
A7	GRČE	301,24	32,74
	JEDROVINA	98,62	10,70
A8	GRČE	295,51	32,12
	JEDROVINA	91,15	9,89
A9	GRČE	291,91	31,73
	JEDROVINA	91,32	9,90
A10	GRČE	280,76	30,52
	JEDROVINA	90,49	9,81
A11	GRČE	283,00	30,76
	JEDROVINA	91,61	9,94
B11	GRČE	27,73	3,01
	JEDROVINA	15,82	1,72
C11	GRČE	10,43	1,13
	JEDROVINA	10,25	1,11
D11	GRČE	6,85	0,74
	JEDROVINA	5,82	0,63
E11	GRČE	8,79	0,96
	JEDROVINA	3,42	0,37

- Vsebnost celokupnih fenolov acetonske ekstrakcije (95 %):

VZOREC		CELOKUPNI FENOLI (mg/L)	CELOKUPNI FENOLI (mg/g)
A1	GRČE	260,79	28,35
	JEDROVINA	84,21	9,13
A2	GRČE	447,84	48,68
	JEDROVINA	172,31	18,69
A3	GRČE	403,13	43,82
	JEDROVINA	180,22	19,55
A4	GRČE	474,78	51,61
	JEDROVINA	156,93	17,02
A5	GRČE	311,72	33,88
	JEDROVINA	184,91	20,06
A6	GRČE	474,18	51,54
	JEDROVINA	93,05	10,09
A7	GRČE	336,38	36,56
	JEDROVINA	124,59	13,51
A8	GRČE	331,94	36,08
	JEDROVINA	113,14	12,27
A9	GRČE	335,03	36,42
	JEDROVINA	113,52	12,31
A10	GRČE	311,91	33,90
	JEDROVINA	114,66	12,44
A11	GRČE	316,55	34,41
	JEDROVINA	112,15	12,16
B11	GRČE	65,73	7,14
	JEDROVINA	25,26	2,74
C11	GRČE	27,13	2,95
	JEDROVINA	13,44	1,46
D11	GRČE	16,98	1,85
	JEDROVINA	11,47	1,24
E11	GRČE	11,89	1,29
	JEDROVINA	7,23	0,78

PRILOGA 6:

- Vrednosti HPLC analize osemfazne protitočne ekstrakcije PSB-133-J2-:

VZOREC	PS (mg/L)	PS MME (mg/L)	PS (mg/g)	PS MME (mg/g)
A1	8,34	23,40	2,10	5,90
A2	8,79	17,34	2,22	4,37
A3	13,13	29,40	3,31	7,41
A4	14,38	29,80	3,62	7,51
A5	11,90	22,04	3,00	5,55
A6	9,00	19,26	2,27	4,85
A7	13,36	26,09	3,37	6,57
A8	11,88	24,15	2,99	6,09
A9	12,56	23,05	3,17	5,81
A10	13,19	25,79	3,32	6,50
B10	7,62	18,22	1,92	4,59
C10	10,91	21,23	2,75	5,35
Č10	8,80	20,98	2,22	5,29
D10	6,68	20,72	1,68	5,22
E10	5,25	19,88	1,32	5,01
F10	5,10	19,88	1,28	5,01
G10	2,14	11,75	0,54	2,96

- Vrednosti HPLC analize petfazne protitočne ekstrakcije vodnih ekstraktov:

VZOREC		PS (mg/L)	PS MME (mg/L)	PS (mg/g)	PS MME (mg/g)
A1	GRČE	30.754	59.890	3,34	6,51
	JEDROVINA	10.628	17.133	1,15	1,86
A2	GRČE	51.567	70.530	5,61	7,67
	JEDROVINA	21.449	27.863	2,33	3,02
A3	GRČE	54.025	72.046	5,87	7,83
	JEDROVINA	21.217	28.816	2,30	3,13
A4	GRČE	61.442	82.438	6,68	8,96
	JEDROVINA	21.450	28.145	2,33	3,05
A5	GRČE	60.601	74.318	6,59	8,08
	JEDROVINA	20.166	26.902	2,19	2,92
A6	GRČE	50.746	71.284	5,52	7,75
	JEDROVINA	19.906	28.818	2,16	3,13
A7	GRČE	51.221	77.568	5,57	8,43
	JEDROVINA	17.122	26.881	1,86	2,92
A8	GRČE	49.051	73.596	5,33	8,00
	JEDROVINA	17.181	27.589	1,86	2,99
A9	GRČE	47.205	74.922	5,13	8,14
	JEDROVINA	17.237	27.036	1,87	2,93
A10	GRČE	48.764	74.756	5,30	8,13
	JEDROVINA	15.966	24.101	1,73	2,61
A11	GRČE	44.114	66.092	4,80	7,18
	JEDROVINA	16.626	26.592	1,80	2,88
B11	GRČE	25.727	70.031	2,80	7,61
	JEDROVINA	7.100	21.834	0,77	2,37
C11	GRČE	15.313	58.241	1,66	6,33
	JEDROVINA	3.392	17.412	0,37	1,89
D11	GRČE	6.835	51.292	0,74	5,58
	JEDROVINA	1.384	10.500	0,15	1,14
E11	GRČE	2.959	36.693	0,32	3,99
	JEDROVINA	0,609	7.938	0,00	0,86

- Vrednosti HPLC analize petfazne protitočne ekstrakcije etanolnih ekstraktov (50 %):

VZOREC		PS (mg/L)	PS MME (mg/L)	PS (mg/g)	PS MME (mg/g)
A1	GRČE	60.767	218.644	6,61	23,77
	JEDROVINA	17.557	53.375	1,91	5,80
A2	GRČE	123.714	292.647	13,45	31,81
	JEDROVINA	43.094	112.733	4,68	12,25
A3	GRČE	127.226	292.541	13,83	31,80
	JEDROVINA	39.683	108.481	4,31	11,79
A4	GRČE	124.987	287.863	13,59	31,29
	JEDROVINA	42.614	109.903	4,63	11,95
A5	GRČE	128.778	286.455	14,00	31,14
	JEDROVINA	43.023	119.048	4,68	12,94
A6	GRČE	73.165	229.878	7,95	24,99
	JEDROVINA	24.648	69.655	2,68	7,57
A7	GRČE	75.577	234.860	8,21	25,53
	JEDROVINA	25.259	71.598	2,75	7,78
A8	GRČE	69.705	224.532	7,58	24,41
	JEDROVINA	21.908	61.876	2,38	6,73
A9	GRČE	67.710	223.458	7,36	24,29
	JEDROVINA	23.067	65.558	2,51	7,13
A10	GRČE	72.576	230.868	7,89	25,09
	JEDROVINA	21.587	60.809	2,35	6,61
A11	GRČE	75.887	222.957	8,25	24,23
	JEDROVINA	22.119	62.735	2,40	6,82
B11	GRČE	3.244	23.804	0,35	2,59
	JEDROVINA	1.445	5.763	0,16	0,63
C11	GRČE	0,519	9.424	0,00	1,02
	JEDROVINA	0	1.567	0,00	0,17
D11	GRČE	0	1.326	0,00	0,14
	JEDROVINA	0	0,573	0,00	0,00
E11	GRČE	0	0	0,00	0,00
	JEDROVINA	0	1,113	0,00	0,12

- Vrednosti HPLC analize petfazne protitočne ekstrakcije etanolnih ekstraktov (60 %):

VZOREC		PS (mg/L)	PS MME (mg/L)	PS (mg/g)	PS MME (mg/g)
A1	GRČE	54.797	204.258	5,96	22,20
	JEDROVINA	20.798	45.865	2,26	4,99
A2	GRČE	115.349	280.369	12,54	30,47
	JEDROVINA	36.438	101.347	3,96	11,02
A3	GRČE	106.646	273.791	11,59	29,76
	JEDROVINA	34.369	95.155	3,74	10,34
A4	GRČE	119.798	287.756	13,02	31,28
	JEDROVINA	40.626	100.280	4,42	10,90
A5	GRČE	112.767	282.054	12,26	30,66
	JEDROVINA	35.205	100.346	3,83	10,91
A6	GRČE	63.255	220.849	6,88	24,01
	JEDROVINA	22.152	61.750	2,41	6,71
A7	GRČE	70.935	229.746	7,71	24,97
	JEDROVINA	20.459	58.164	2,22	6,32
A8	GRČE	62.223	211.075	6,76	22,94
	JEDROVINA	19.693	59.582	2,14	6,48
A9	GRČE	57.835	204.826	6,29	22,26
	JEDROVINA	21.340	61.961	2,32	6,73
A10	GRČE	61.967	214.236	6,74	23,29
	JEDROVINA	20.060	57.152	2,18	6,21
A11	GRČE	59.723	209.152	6,49	22,73
	JEDROVINA	19.673	56.661	2,14	6,16
B11	GRČE	2.109	10.030	0,23	1,09
	JEDROVINA	1.073	4.040	0,12	0,44
C11	GRČE	0,322	2.137	0,00	0,23
	JEDROVINA	0,419	2.699	0,00	0,29
D11	GRČE	0,323	1.498	0,00	0,16
	JEDROVINA	0	1.573	0,00	0,17
E11	GRČE	0	0,985	0,00	0,00
	JEDROVINA	0	1.093	0,00	0,12

- Vrednosti HPLC analize petfazne protitočne ekstrakcije acetonskih ekstraktov (95 %):

VZOREC		PS (mg/L)	PS MME (mg/L)	PS (mg/g)	PS MME (mg/g)
A1	GRČE	59.244	212.484	6,44	23,10
	JEDROVINA	17.679	52.338	1,92	5,69
A2	GRČE	112.652	281.513	12,24	30,60
	JEDROVINA	35.763	102.615	3,89	11,15
A3	GRČE	127.408	296.204	13,85	32,20
	JEDROVINA	38.831	107.004	4,22	11,63
A4	GRČE	131.236	295.907	14,26	32,16
	JEDROVINA	33.729	96.475	3,67	10,49
A5	GRČE	131.578	305.976	14,30	33,26
	JEDROVINA	45.229	122.618	4,92	13,33
A6	GRČE	78.841	241.716	8,57	26,27
	JEDROVINA	25.581	72.645	2,78	7,90
A7	GRČE	77.955	233.113	8,47	25,34
	JEDROVINA	25.982	77.399	2,82	8,41
A8	GRČE	77.968	238.326	8,47	25,91
	JEDROVINA	24.218	68.386	2,63	7,43
A9	GRČE	79.862	241.842	8,68	26,29
	JEDROVINA	23.043	67.404	2,50	7,33
A10	GRČE	68.342	233.062	7,43	25,33
	JEDROVINA	22.922	66.067	2,49	7,18
A11	GRČE	75.384	235.240	8,19	25,57
	JEDROVINA	21.797	65.780	2,37	7,15
B11	GRČE	7.577	24.085	0,82	2,62
	JEDROVINA	1.922	7.017	0,21	0,76
C11	GRČE	0,725	3.520	0,00	0,38
	JEDROVINA	0,404	2.421	0,00	0,26
D11	GRČE	0,296	1.770	0,00	0,19
	JEDROVINA	0,305	2.047	0,00	0,22
E11	GRČE	0	1.227	0,00	0,13
	JEDROVINA	0	0,373	0,00	0,00