

OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

RAZISKOVANJE BIOLOŠKO AKTIVNIH UČINKOVIN V IGLICAH NAVADNE SMREKE (*PICEA ABIES*) Z MACERACIJO RASTLINSKEGA MATERIALA

RAZISKOVALNO DELO, PODROČJE: KEMIJA IN KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

AVTORICA:

Sara Čopar, učenka 9. razreda

MENTORJI:

Marko JERAN, strok. sod., Zdravstvena fakulteta in

Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Milena ŽOHAR, prof., OŠ Primoža Trubarja Laško

dr. Urban NOVAK, univ. dipl. biokem., Kemijski inštitut Ljubljana



Univerza v Ljubljani



KEMIJSKI INŠTITUT

LAŠKO, 2020

Z A H V A L A

Spoštovani mentorji, vsem iskrena hvala za vso pomoč. Brez vas mi ne bi uspelo.

Zahvaljujem se učiteljici, gospe *Mileni Žohar* za izrečene spodbudne in prijazne besede ter za pomoč pri sami nalogi. Hvala, ker ste mi bili na voljo tudi ob poznih urah in me prenašali izven vašega delovnega časa, kadar sem vas potrebovala.

Iskrena hvala gospodu *Marku Jeranu*, strokovnemu sodelavcu Zdravstvene fakultete in Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, za vse kritike, vzpodbudne besede in dobre nasvete, ki so mi bili v veliko pomoč skozi vse obdobje nastajanja naloge. Hvala tudi, ker ste vame verjeli ne glede na kakršne koli vzpone in padce. Vi ste zaslužni, da je naloga dobila strokovno dopolnilo.

Veliko zahvalo namenjam dr. *Urbanu Novaku* iz Kemijskega inštituta Ljubljana. Najlepša hvala za vašo strokovno pomoč in usmerjanje pri opravljanju zahtevnih postopkov in meritev, za topel sprejem in vse informacije o uporabi zapletenih aparatov.

Iskreno se zahvaljujem inženirju gozdarstva, gospodu *Simonu Kovaču*, revirnemu gozdarju za gospodarsko enoto Jurklošter iz Zavoda za Gozdove Slovenije, Krajevne enote Laško, za pomoč pri pridobivanju in pripravi vzorcev in njegovi ženi, gospe *Brigiti Kovač* za prijazno in prijetno sodelovanje.

Iskrena hvala doc. dr. *Danilu Bevku* iz Nacionalnega inštituta za biologijo Ljubljana (NIB) za odgovore na mnoga zastavljena vprašanja iz entomologije in gozdne biologije.

Hvala tudi učiteljici slovenščine, gospe *Lidiji Toplišek* za pravopisni pregled naloge. Najlepša hvala, ker ste si vzeli čas in mi dali koristne nasvete in predloge.

Za zagotovitev varnostnih sredstev, opreme, pripomočkov in topil se zahvaljujem Osnovni šoli Primoža Trubarja Laško. Vse to je bilo ključno za uspešno opravljanje naloge v šolskih prostorih.

Zahvala velja Kemijskemu inštitutu Ljubljana za topel in prijazen sprejem. V vaših prostorih sem spoznala ogromno novih, zanimivih stvari in se veliko naučila. Hvala za izjemno lep sprejem na Zdravstveni fakulteti in Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer sem pridobila veliko uporabnih informacij.

Zelo veliko mi je pomenila vsestranska pomoč staršev. Iz srca hvala za vse spodbudne besede in podporo.

Najlepša hvala vsem!



*»Drevo vdihne to, kar izdihne človek.
Človek vdihne tisto, kar gozd izdihne!«*

Jože Prah

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	3
POVZETEK	5
1. UVOD.....	7
1.1 PRISTOP K DELU.....	7
2. TEORETIČNI DEL	9
2.1 IGLAVCI	9
2.2 NAVADNA SMREKA.....	12
2.3 PODLUBNIKI	14
2.3.1 LUBADARJI	14
2.4 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V NAVADNI SMREKI	17
2.5 LIMONEN	17
2.6 BORNEOL.....	20
2.7 MACERACIJA.....	21
2.8 IR-SPEKTROSKOPIJA.....	23
2.9 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA	26
2.10 HIPOTEZA	26
3. EKSPERIMENTALNI DEL	28
3.1 UVOD	28
3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE.....	28
3.3 APARATURE IN INVENTAR	29
3.4 PRIPRAVE VZORCEV.....	30
3.5 PRIPRAVA MACERATOV NAVADNE SMREKE.....	33
3.6 KVANTITATIVNA DOLOČITEV LIMONENA IN BORNEOLA V MACERATIH NAVADNE SMREKE Z UPORABO FTIR-SPEKTROSKOPIJE	34
4. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	35
4.1 REZULTATI MACERACIJE IGLIC ZDRAVE IN BOLNE NAVADNE SMREKE	35
4.2 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČITEV LIMONENA IN BORNEOLA S FTIR- SPEKTROSKOPIJO.....	37
5. ZAKLJUČEK.....	44
6. LITERATURA	46
7. DODATEK	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Izomerni strukturi limonena (Naturstoffe & Forschung, 2020)	19
Slika 2: Struktura (-)-borneola (Merck, 2020)	21
Slika 3: Shematski prikaz spektra elektromagnetnega valovanja (Svetila LED, 2013)	24
Slika 4: Aparatura za FTIR-spektroskopijo (Fotografija last avtorice)	29
Slika 5: Štor zdrave smreke (Fotografija last avtorice)	30
Slika 6: Štor bolne smreke (Fotografija last avtorice)	31
Slika 7: Veje z iglicami zdrave smreke (Fotografija last avtorice)	32
Slika 8: Iglice bolne smreke (Fotografija last avtorice)	32
Slika 9: Sušenje iglic v sušilniku (Slika last avtorice)	33
Slika 10: Potek maceracije (Fotografija last avtorice)	34

KAZALO TABEL

Tabela 1: Količine pripravljene macerate	36
Tabela 2: Rezultati vsebnosti limonena in borneola v maceriranih vzorcih	41
Tabela 3: Varnostna opozorila kemikalij	50

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Spekter standardnega limonena in standardnega borneola	37
Graf 2: FTIR spektra standardnega limonena (rdeče barve) in standardnega borneola (modre barve)	38
Graf 3: FTIR spektra dveh izolatov, ki pričata o raznovrstni sestavi posameznih izolatov	39
Graf 4: FTIR spektri limonena (rdeče barve), borneola (modre barve) in dveh posameznih izolatov (zelena in črna barva). Delež limonena in borneola smo določili z odštevanjem spektrov limonena in borneola od spektrov izolatov do točke, ko na spektrih izolatov nismo več videli trakov, ki pripadajo limonenu in borneolu. Pri odštevanju smo se oprli na najintenzivnejše trakove limonena in borneola, na grafu 3 označene s puščicami.	39
Graf 5: FTIR spektri limonena (rdeče barve), borneola (modre barve) in dveh posameznih izolatov (zelena in črna barva) v regiji prstnega odtisa. Pri odštevanju smo kot indikator za limonen uporabili trakova pri 1644 cm^{-1} in 886 cm^{-1} . Trak pri 1644 cm^{-1} pripišemo valenčnemu nihanju cikličnih C=C skupin. Trak pri 886 cm^{-1} pripada valenčnemu nihanju C-H skupin v cikloheksenskem obroču. Kot indikator za borneol smo uporabili trakova pri 1068 in 1004 cm^{-1} , ki se nahajata v območju C-O valenčnega nihanja.	40

POVZETEK

Navadna smreka, *lat. Picea abies*, predstavlja prvo golosemenko s popolnoma sekvencioniranim genom. Njen genom je velik 20 milijonov baznih parov in vsebuje veliko repetitivnih odsekov DNA. V različnih delih rastline vsebuje mnoge biološko aktivne spojine, med katere sodita tudi borneol in limonen. Borneol se nahaja v več kot 260 rastlinah in je sestavina mnogih eteričnih olj, ki se nahajajo v smoli dreves z iglicami. V mnogih eteričnih oljih in začimbah najdemo tudi tekoč ogljikovodik – ciklični terpen, limonen.

S postopkom maceracije oz. z ekstrakcijo »trdno-tekoče« smo raziskovali optimalne pogoje priprave z limonenom in borneolom obogatenih izolatov iglic. Obenem smo na podlagi rezultatov FTIR-spektroskopije uspeli pokazati, da obstaja razlika v vsebnosti komponent med zdravo in s podlubniki okuženo smreko. Najvišjo vsebnost limonena zaznamo v maceratu iglic z uporabo nizkopolarnega petroletra. Iglice zdrave smreke, macerirane v polarnem etanolu, vsebujejo visoko vsebnost borneola po enotedenski izpostavitvi rastlinskega materiala topilu na sobni temperaturi (22 °C). Podoben rang vsebnosti lahko opazimo tudi pri enourni maceraciji ob povišani temperaturi, ki je znašala 52 °C.

KLJUČNE BESEDE: Navadna smreka, *Picea abies*, limonen, borneol, kemija naravnih spojin, izolacija, maceracija, insekticid, biološko aktivne spojine

ABSTRACT

European spruce, *lat. Picea abies*, represents first gymnosperm with completely sequenced genome. Its genome has 20 million base pairs and contains many repetitive DNA sections. The plant contains many biologically active compounds among which we can find borneol and limonene. Borneol can be found in over 260 plants and it is an ingredient of many essential oils, which are extracted from the resin of coniferous trees. In the many essential oils and spices we also find liquid hydrocarbons – cyclic terpene, limonene.

With the maceration process or with »solid-liquid« extraction we were searching the optimal conditions for isolation of limonene and borneol enriched needle isolates. Based on the results with FTIR-spectroscopy we managed to show there is a difference in the content of compounds between healthy and bark beetle (*lat. Scolytinae*) infected European spruce. The highest content of limonene we detect in the spruce needle macerate with using the low-polar petroleum. The needles of the healthy spruce which were macerating in polar ethanol, contain high content of borneol after one week extraction of the plant material to the solvent at room temperature (22 °C). We can observe a similar percentage of borneol after one-hour maceration at 52 °C.

KEYWORDS: European spruce, *Picea abies*, limonene, borneol, natural compounds, isolation, maceration, insecticide, biological active compounds

1. UVOD

V naravnih virih so prisotne mnoge kemijske učinkovine, ki materialu dajejo ustrezne biološke lastnosti, npr. antioksidativnost, protimikrobno delovanje, protitumorsko aktivnost in podobno. Eden takih je vsem poznana navadna smreka. Drevesni deli navadne smreke vsebujejo različno sestavo kompleksnih biološko aktivnih snovi; sestava le-teh je odvisna od različnih dejavnikov (npr. podnebja, letnega časa vzorčenja ipd.). V raziskovalnem delu smo se osredotočili predvsem na spremljanje vsebnosti limonena in borneola.

Limonen je tekoč ogljikovodik brez barve. Industrijsko ga pridobivajo s stiskanjem olupkov pomaranč in limon, ki so odpadni material po pridobivanju sadnega soka. V šolskem laboratoriju ga lahko pridobivamo na več različnih načinov. Danes je zaradi pretirane uporabe sintetičnega limonena na njegovo vonjavo alergičnih vse več ljudi. Kljub vsemu ostaja limonen pomemben naravni antibiotik (Ahtik, Užmah, 2018).

Borneol je monoterpenski alkohol. Ima le eno hidroksilno funkcionalno skupino, sestavljen pa je iz dveh med seboj povezanih ogljikovodikovih obročev, torej je nepolaren (Gril, Šivavec, 2019).

V sklopu raziskovalnega dela je bila s pomočjo maceracije opravljena primerjava količinske vsebnosti limonena in borneola v posušeni iglicah zdrave in bolne smreke. Rokovali smo z različnimi pogoji izolacije, saj je poznavanje le-teh pomembno pri snovanju mnogih inženirskih postopkov v kemijski (separacijski) industriji.

1.1 PRISTOP K DELU

Večino praktičnega dela naloge smo opravili v šolskih prostorih. Del eksperimentalnega sklopa smo zaradi uporabe posebne opreme in tehnologije opravili v Laboratoriju za strukturo biomolekul v sklopu Teoretičnega odseka Kemijskega inštituta v Ljubljani. Tamkajšnje delo je nadzorovalo

tehnično usposobljeno osebje v sodelovanju z mentorji. Vso potrebno opremo sta nam zagotovila šola in inštitut. Na inštitutu smo bili predhodno seznanjeni z varnostnimi predpisi in delovnim procesom, tako da je bilo rokovanje z reagenti in vzorci v skladu z uveljavljeno zakonodajo varnostne kulture. Ker so bile kemikalije opremljene z oznakami za nevarne snovi, smo z njimi ravnali v skladu s predpisi o tovrstnih snoveh. Skozi celotno delo smo imeli na voljo vsa zaščitna sredstva (rokavice, zaščitna očala in haljo) in smo sledili varnostnim opozorilom.

2. TEORETIČNI DEL

2.1 IGLAVCI

Iglavci sestavljajo velik del rastlinske odeje v hladnejših delih sveta. V nepretrganem loku se iglasti gozdovi vlečejo od Norveške do vzhodne Sibirije, naravnost naprej v Kanado. To je stara skupina rastlin. Okamnine kažejo, da je bilo njihovo območje nekoč mnogo bolj prostrano kot danes. V današnji dobi so vrste iglavcev v srednjeevropskem delu številčno zelo majhne. Iglaste gozdove sestavljajo pretežno le smreka, jelka, bor in macesen. Spodrivati so jih začeli listavci, zlasti v toplejših predelih, tako da je iglavcev znatno manj kot listnatega drevja. Vendar iglavci med vsemi živimi bitji na Zemlji dosegajo največjo starost in najvišje zrasede. Nekatere vrste so pravi drevesni orjaki, kot na primer orjaške sekvoje.

Iglavec je tip rastline, ki združuje določene značilnosti – na splošno so iglavci drevesa ali grmi, golosemenke, najpogosteje z igličastimi listi, skoraj vse so zimzelene z mehkejšim smolnatim lesom in pogosto s storži. Taka je človekova najpogostejša praktična predstava o tej veliki skupini rastlin, čeprav je med njimi veliko izjem, na primer macesen, ki ni zimzelena rastlina, les tise ni smolnat in tisa nima storžev in podobno (Majcen, 2012).

Iglavci so lesnate rastline, torej drevesa in grmi. Drevesa imajo deblo, ki se razrašča v veje in oblikuje krošnjo, grm je večinoma nižji in se mu širijo veje že takoj pri tleh. Nekateri iglavci so v svoji domovini drevesa, pri nas pa zrasede le kot grmi, in sicer zaradi različnega podnebja.

Iglasta drevesa imajo več delov.

- Korenine dajejo rastlini oporo in ji dovajajo vodo z mineralnimi snovmi. Nekatera imajo korenine razporejene zelo plitvo (npr. smreka), druga pa globoko (npr. bor).

- Deblo ali olesenelo steblo je pri drevesih po navadi le eno, včasih pa je tudi več močnih in visokih debel. Pri grmih je debel vedno več, ki so tanka in ne segajo v velike višine. Lubje je varovalno tkivo drevesnega debla in vej pred izsušitvijo, prehudo vročino, zmrzalmi in žuželkami.
- Veje rastejo po deblu raztreseno ali si stojе nasproti; so pokončne, povešene, viseče, vodoravne ipd. in sestavljajo krošnjo drevesa. Ta pa daje (v večini) drevesu zanj značilno obliko. Raznolikost oblik krošenj je zelo pestra: stožčasta, stebrasta, jajčasta, viseča, ležeča, pokončna idr.
- Iglíčasti listi so popolnoma drugačni kot listi pri listavcih. Imajo obliko iglic ali lusk, vzporedne žile in trdo ali usnjato površino. Lahko so tanki, debeli, prožni, togi ali različno razvrščeni po vejicah. Vsi so vedno zeleni in ostanejo na drevesu po več let. Drevesu (razen macesnu) iglice odpadajo postopoma skozi vse leto, sproti pa rastejo nove.
- Cvetovi pri iglavcih niso taki, kot jih poznamo pri večini drugih rastlin. Kot posebno obliko cveta oblikujejo storže, v katerih so razmnoževalni organi. Cvetovi iglavcev so vedno enospolni, saj so v moškem cvetu le prašniki, v ženskem cvetu pa le semenske zasnove. Ženski cvetovi so združeni po več skupaj v socvetja. Pri opráševanju večinoma pomaga veter, zato nosijo iglavci cvetove le na zgornjih vejah starejših rastlin, in to predvsem na koncu vejic, saj je to najboljše mesto, da veter cvetni prah zanesljivo odpihne. V večini so enodomna vrsta rastlin – imajo ženske in moške cvetove ločene na isti rastlini. Izjema sta brin in tisa, ki sta dvodomni rastlini – ženski in moški cvetovi rastejo na ločenih rastlinah.
- Plodove iglavcev imenujemo storži ali češarki. Ti so olesenela in povečana socvetja oprášenih ženskih cvetov. V njih so semena. Večina storžev se ob dozorelosti odpre in tako lahko seme izpade. Nekateri storži (npr. pri cedri) v celoti razpadejo na drevesu, tako da ostane na poganjku samo os storža. Prazni storži odpadejo ali ostanejo na drevesu še nekaj let. Semena imajo ponekod krilca, da jih laže odnaša veter. Odpiranje in zapiranje storžev je odvisno od zračne vlage. Na suhem se

bodo storži odprli, v vlagi pa bodo ostali zaprti. Tak način prilagajanja je nujno potreben: če bi se namreč storži na vlagi odpirali, na primer v dežju, bi semena padla naravnost na tla pod isto drevo in ne bi prišla do novih rastišč. Ker se storži odpirajo v suhem vremenu, lahko veter odnese semena drugam.

Pri iglavcih, kot sta brin in tisa, se zdi, da nimata »pravih« storžev, pač pa nekakšne okroglaste jagodaste storžke. Brinova »jagoda« je pravi storž, saj se storž vedno razvije iz socvetja, le da so njene plodne luske omesenele. Pri tisi plod ne more biti storž, ker se je razvil le iz enega samega cveta. Tu je seme obdano z mesnatim ovojem.

Glede na vse omenjene značilnosti v skupino iglavcev prištevamo:

- borovke: vse vrste jelk, smrek, borov, ceder, macesnov
- cipresovke: brini, ciprese
- tisovke: tisa.

Poleg vseh vrst, ki jih še najdemo v naravnih rastiščih ali kot rezultat pogoždovanj, jih gojimo tudi v vrtovih, parkih in nasadih. V hortikulturi imajo posebno mesto že od 17. stoletja dalje, ko so začeli spoznavati in nasajati prekomorske vrste teh dreves. Iglavci rasejo hitreje kot listavci, zato jih tudi največ sadijo za les. Njihov les je v gospodarskem smislu zelo pomemben. Iz njega izdelujejo vse od ostrešij, embalaže do pohištva, vrhunskih glasbenih instrumentov in še česa (Majcen, 2012).

Iglice rastlin prenesejo tako sušo kot mraz. Imajo debelo voskasto prevleko, zelo malo drevesnega soka, ki bi lahko zmrznil, listne reže so razporejene na dnu žlebiča, ki teče po vsej dolžini iglice. Listi te oblike poleti ne morejo delati tako produktivno kot ploski listi, vendar jih drevesu pozimi ni treba odvreči, kar mu prihrani veliko energije. Če je pozimi vmes še kakšno kratko obdobje toplejšega, sončnega vremena, lahko celo proizvajajo hrano.

Iglavci so najstarejši organizmi na Zemlji. Tri tisoč metrov visoko v planinah v Kaliforniji rastejo najstarejša drevesa, in sicer eden od borov vrste *Pinus*

longaeva. Ta starodavna drevesa so zakrnela in zelo prizadeta. Najvišje meri samo 9 metrov, mnoga ne več kot 3. Veliki deli njihovih grčavih debel so popolnoma mrtvi. Toda na nekaterih vejah so šopi zelenih iglic, ki dokazujejo, da je v drevesih še življenje.

Ugotovili so, da je nekaj teh dreves starih več kot 4600 let. Bila so že prastara, ko je Kolumb odkril Ameriko. Bila so v najboljših letih, ko so v Egiptu vladali faraoni, in vzknila so ravno takrat, ko so človeška bitja na vhodnem koncu Sredozemlja odkrivala, kako lahko sadijo, sejejo in se za stalno naselijo (Majcen, 2012).

Največje živo bitje, kar jih je kdaj videl svet, je tudi iglavec. Nižje v kalifornijskih planinah rastejo gozdiči orjaških sekvoj. Nekatere so tako velike in naredijo tako plemenit vtis, da so dobila svoja lastna imena. Sekvoja General Grant je visoka kar 88 m in njen obseg debela znaša skoraj 24 m. Stara je približno 2500 let (Majcen, 2012).

Navada krašenja smrek in drugih iglavcev se je močno razširila šele v 19. stoletju; uporaba zimzelenih rastlin za krašenje je bila znana že veliko pred krščanstvom, saj so zelene iglice uporabljali pri poganskih zimskih praznovanjih za oznanjanje vrnitve pomladi (Majcen, 2012).

2.2 NAVADNA SMREKA

Družina: borovke (*Pinaceae*)

Red: borovci (*Pinales*)

Velikost: 25–50 m

Razširjenost: zelo pogosta vrsta

Življenjski prostor: pri nas le kot okrasno drevo po parkih, v bližini domov ali v plantažnih sestojih

Ogroženost vrste: vrsta ni ogrožena

Varstveni status vrste: / (Navadna smreka (*Picea abies*), b. d.)

Navadna smreka ali latinsko *Picea abies*, kar pomeni smolnato drevo, je najbolj razširjena po Evropi. Med smrekami, gledano v splošnem, ima največje storže. Je prva golosemenka, katere celoten genom je bil sekvencioniran. Projekt so izvedli leta 2013 in odkrili, da je njen genom velik 20 milijonov baznih parov in vsebuje veliko repetitivnih odsekov DNA.

Navadna smreka spada v rod borovk, ki obsega približno 35 zimzelenih rastlin. Omenjena smreka spada med iglavce in ima ukrivljene veje, na katerih rastejo temno zelene iglice, dolge od 10 do 25 mm. Na koncih vej rastejo storži, tako da visijo navzdol. Sprva so storži zeleni in povsem zaprti; ko dozori, ponavadi jeseni, pa postanejo rjavkasti. Ko zunanji pogoji zadoščajo pogojem za razmnoževanje, se luske razprejo in veter ponese semena v okolico. Smreka se od jelke loči le po eni lastnosti, in sicer po tem, da ima smolne kanale (jelka jih nima). Navadna smreka v višino zraste od 20 do 30 m, njena širina lahko meri od 5 do 7 m. Deblo je prekrito z zelo hrapavim lubjem.

V Sloveniji je znanih mnogo vrst smreke. Med seboj se jih ločuje po storžih in listih, ki so spremenjeni v iglice. Lahko imajo:

- storže z debelimi luskami in kvadratne liste na prečnem prerezu,
- storže s priostrenimi konicami ter delno tope in delno priostrene liste,
- storže z gladko zaokroženimi luskami ter delno tope in delno priostrene liste,
- storže z gladko zaokroženimi luskami in liste, ki imajo zelo ostre konice,
- storže z debelimi in valovitimi luskami in sploščene liste,
- storže z večinoma zaokroženimi luskami in na prerezu sploščene liste, ki so v spodnjem delu beli,
- storže, ki so večinoma luskasti in valoviti, in na prerezu rahlo sploščene liste, ki so v spodnjem delu beli,
- storže z zelo tankimi in valovitimi luskami.

Navadna smreka (*Picea abies*) sodi med vrste, ki imajo storže s priostrenimi konicami, liste pa ima nekoliko tope oziroma nekoliko priostrene. Kot že

omenjeno je po Evropi zelo razširjena, prevladuje zlasti v severnem delu. Brez posebnosti raste po višjih kot tudi nižjih predelih gozda.

Navadno smreko se pogosto uporablja za kurjavo in izdelavo papirja. Že v preteklosti so jo uporabljali za izdelavo zdravilnih smrekovih pripravkov, saj so smrekovi vršički izredno bogati z vitaminom C, kar še dandanes izkoriščamo za pripravo različnih zdravil. V preteklosti so med drugim navadno smreko uporabljali tudi za kopeli, inhalacije in mazila, saj blaži simptome bolezni dihalnih poti, poleg tega pa je tudi učinkovita v boju proti infekcijam in težavam s kožo (Gril, Šivavec, 2019).

2.3 PODLUBNIKI

Podlubniki so največji škodljivci v naših gozdovih. V obdobju od leta 2003 do 2009 je bilo zaradi podlubnikov posekanih 3,5 milijona dreves, večinoma zaradi napadov lubadarjev. Med podlubniki največ škode povzročajo lubadarji, ki lahko povzročijo propad celih sestojev. Podlubniki so majhni hrošči valjaste oblike, veliki do 5 mm. V lubje dreves izvrtajo majhno luknjico in nato pod lubjem izdolbejo rove. Rove delajo odrasli osebki in ličinke. Vzorci rogov so značilni za posamezno vrsto. Podlubnike delimo na lubadarje, ličarje in lesarje. Lubadarji povzročajo največjo škodo v gozdovih, saj zaradi njih propadejo drevesa, lesarji pa običajno razvrednotijo les in povzročajo škodo lesni industriji. Podlubniki napadajo drevesa, ki so prizadeta zaradi bolezni, suše, poškodb, ujm in smoga. Večina podlubnikov se prehranjuje s floemom ali z odmrlim lesom, nekateri pa v rove naselijo glivo, ki jim predstavlja vir hrane (Gozd in gozdarstvo, 2012).

2.3.1 LUBADARJI

Gospodarsko pomembni lubadarji napadajo iglavce. Največjo škodo povzročajo na smrekah. Napadene smreke na neprimernih rastiščih lahko v celoti propadejo, kar ima za posledico obsežne sanitarne sečnje, ki lahko v

primeru monokulturnega gozda privedejo v golosečnjo. Lubadarji pri nas povzročajo škodo predvsem na smreki, jelki in boru. Napadene smreke in jelke imenujemo lubadarke. Zanje je značilno, da jim začne propadati krošnja (spremeni barvo), na lubju je mogoče videti drobne luknjice, drevesa se smolijo. Sčasoma začnejo odpadati iglice in v zadnji fazi se začne luščiti skorja. Drevo propade.

Lubadarje zatiramo z lovljenjem v posebne pasti. V njih so vrečke s feromoni, ki privabijo lubadarje.

Za preprečevanje širjenja lubadarjev izvajamo predvsem preventivne ukrepe. Skrbimo za primerno drevesno sestavo, izvajamo sanitarne ukrepe, redno odstranjujemo sveže napadeno drevje, posekan les čim prej odpeljemo iz gozda in pri sečnji strogo upoštevamo predpisani gozdni red. Kadar se nekatere vrste preveč razširijo, jih aktivno zatiramo z lovljenjem v pasti in uporabo lovnih dreves in lovnih debel (Gozd in gozdarstvo, 2012).

Osmerozobi smrekov lubadar (*Ips typographus*) napada smreko, opazili pa so ga tudi na borih in jelki. Odrasli hrošček je velik od 4 do 5,5 mm, rdečerjave ali črnorjave barve. Na zadnjem delu pokrovk ima na vsaki strani po 4 zobce, skupaj torej 8. Od tu tudi ime osmerozobi. Ličinka je bela z rumenorjavo glavo. Buba je bele barve. Odrasli hrošči potrebujejo spomladi temperature nad 12 stopinj Celzija, da nehajo prezimovati, in vsaj 3 dni temperature nad 15 stopinj, da začnejo napadati drevesa. Samček v lubje izvrta luknjico in napravi kotilnico, v katero privabi običajno tri samice. Te med skorjo in lesom izdelajo do 15 cm dolge in okoli 2,5 mm široke rove, v katere odlagajo jajčeca. Ličinke izvrtajo rove stran od samičinega rova v ličju in skorji. Letno razvije dve, v ugodnih pogojih tri generacije. Osmerozobi smrekov lubadar najbolj ogroža čiste smrekove sestoje, stare med 80 in 100 let. Napada poškodovana (ujme, mehanske poškodbe), oslabela in bolna drevesa. Napade tudi sveže posekano drevje (hlode in debele veje), kadar pa se močno razširi, napade tudi zdrave smreke. Škoda, ki jo povzroča, je lahko zelo velika, saj lahko uniči sestoje smreke na večjih površinah.

Šesterozobi smrekov lubadar (*Pityogenes chalcographus*) napada smreko, tu in tam ga najdemo tudi na boru, macesnu in jelki. Odrasel hrošček je velik od 1,8 do 2,8 mm, Na zadnjem delu pokrovk ima 6 zobcev (na vsaki pokrovki 3), ki so pri samčkah bolj izraziti. Hroščki rojijo (se pari) aprila in maja ter občasno julija in avgusta. Samček izvrti luknjico v lubje, pridruži pa se mu od 3 do 6 samic, ki nato zvezdasto izdelajo rove, dolge od 2 do 6 cm in široke 1 mm. Ličinke izdolbejo kratke hodnike. Napada veje in vrhove dreves, kjer je lubje tanjše. Ogrožena so oslabela, poškodovana in podrtá drevesa. V ugodnih razmerah se lahko močno namnoži in napade zdrava drevesa.

Dvanajsterozobi borov lubadar (*Ips sexdentatus*) napada bor in tudi jelko, smreko, macesen in duglazijo. Je največji med našimi lubadarji. Odrasel hrošček je velik od 5,5 do 8 mm in temno rjave barve. Vratni ščit mu povsem prekriva glavo. Na zadnjem delu ima na vsaki pokrovki po 6 zobcev (skupaj 12). Rojijo aprila in maja ter običajno še julija in avgusta. Samček pod skorjo oblikuje kotilnico, v kateri se mu pridruži od 2 do 5 samic. Samice izdolbejo navpične rove, ki so dolgi do 50 cm in široki do 5 mm. Rovi ličink so postavljeni prečno in so dolgi do 10 cm, na koncu pa imajo veliko bubilnico. Napada predvsem oslABLJENO in poškodovano drevje ter sveže posekano drevje. Če se močno namnoži, lahko napade tudi zdrava drevesa.

Krivozobi jelov lubadar (*Pityokteines curvidens*) napada predvsem jelko, opazimo ga tudi na nekaterih drugih iglavcih. Je svetlo rjav od 2,5 do 3 mm velik hrošček. Na zadnjem delu pokrovk ima 6 zobcev. Roji na začetku aprila in julija. Najpogosteje napada obolelo staro drevje in poškodovana drevesa. Napada tudi sveže posekana drevesa.

Zrnati jelov lubadar (*Cryphalus piceae*) napada predvsem jelke. Je rjave barve in velik od 1 do 2 mm. Roji marca, aprila ter julija in avgusta. Na pokrovkah nima zobcev. Napada oslabela in poškodovana drevesa. Napade tudi posekano drevje (Gozd in gozdarstvo, 2012).

2.4 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V NAVADNI SMREKI

Biološko aktivna snov je snov, ki ima na živ organizem nekakšen učinek. Zanimajo nas snovi, ki imajo na organizme pozitivne učinke oz. učinke, ki bi jih kasneje lahko uporabili za zdravljenje. Sama aktivnost je odvisna od uporabljene doze neke substance. Da pa je neka učinkovina zares biološko aktivna, mora izpolnjevati tudi pravila ADME (*angl. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*).

Nekatere dokazane biološko aktivne snovi v navadni smreki so:

- *p*-hidroksibenzojska kislina (PHBA) in njeni glukozidi,
- piceol (in njegov glukozoid picein); piceol se uporablja v farmacevtski industriji za izdelavo zdravilnih učinkovin,
- picetanol (in glukozoid, imenovan astringin),
- ferulična kislina, ki je osnova za pripravo aromatičnih spojin,
- izorhapontin,
- katehin, naravni antioksidant in sekundarni metabolit rastlin,
- astringin.

Večina aktivnih substanc se nahaja v koreninah.

Pomemben predstavnik vodotopnih vitaminov je vitamin C, ki se nahaja v smrekovih vršičkih. Gre za enega izmed najpomembnejših antioksidantov v ekstracelularni tekočini in se uživa peroralno (Gril, Šivavec, 2019).

2.5 LIMONEN

Limonen oz. 1-metil-4-(1-metiletetil)cikloheksen je ogljikovodik, ki je pri sobni temperaturi v tekočem stanju in brez barve. Uvrščamo ga med ciklične terpene z enim obročem. Ime je dobil zaradi precejšnje vsebnosti v limonini lupini in lupinah drugih citrusov, kar daje le-tem tudi značilen vonj. Najpogostejša oblika limonena je D-limonen, ki je enantiomer, ima močan vonj pomaranče in ga pridobivamo iz lupine citrusov s centrifugiranjem in parno destilacijo.

Limonen je terpen z vonjem po limoni, ki ga najdemo v mnogih eteričnih oljih in začimbah. Na vonjavo limonena je dandanes alergičnih vse več ljudi. Kljub temu ostaja limonen pomemben naravni antibiotik. Najdemo ga v eteričnih oljih citrusov, bora, smreke, jelke, mirte, kumine, sporiša, travniške kadulje, materine dušice, mete, sivke, ameriškega slamnika (*Echinaceje*), navadnega rmana in mnogih drugih rastlin. Limonen industrijsko pridobivajo s stiskanjem olupkov pomaranč in limon, ki so odpadni material po pridobivanju sadnega soka.

Primarni naravni vir limonena so citrusi, iz katerih je mogoče pridobiti D-limonen, ki predstavlja enantiomerno obliko. Racemni limonen je znan kot dipenten. Limonen kot aktivna učinkovina je prisoten tudi v smoli iglavcev, saj služi za obrambo pred žuželkami.

Kemijske lastnosti

Limonen je relativno stabilen terpen in ga je mogoče destilirati, ne da bi razpadel. Kljub temu pri visokih temperaturah razpade in tvori izopren. V vlažnih razmerah hitro oksidira in tvori karveol, karvon in limonen oksid. Z žveplom dehidrogenizira v *p*-cimen.

Uporaba

Poleg proizvodnje karvona se uporablja tudi v kozmetičnih izdelkih, in sicer kot dodatek za vonj po citrusih. D-limonen se v prehranski industriji in nekaterih zdravilih uporablja za prekritje grenkega okusa alkaloidov in kot dišava v parfumih, čistilih in razkužilih za roke. Prav tako je limonen naravni rastlinski insekticid.

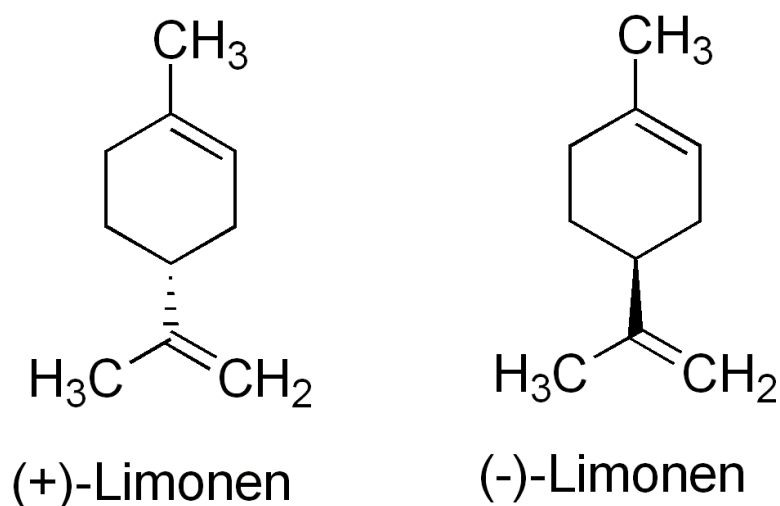
V naravni medicini je D-limonen znan kot zdravilo proti gastroezofagealni refluksni bolezni in zgagi. Ker je pridobljen iz obnovljivih virov (iz pomarančnega olja, ki je stranski produkt pri proizvodnji pomarančnega soka), je njegova uporaba vedno bolj razširjena v čistilnih sredstvih, kjer je prisoten kot topilo za olje v strojnih delih. Služi tudi kot odstranjevalec barv za les ali dišavna alternativa terpentinu. Prav tako je kot topilo prisoten v nekaterih lepilih za

modeliranje. Naravne osvežilce zraka, ki vsebujejo limonen, uporabljajo tudi filatelisti za odstranjevanje znamk z razglednic. Je vnetljiv in obravnavan tudi kot biogorivo.

Pri pripravi tkiva za histološke preiskave je D-limonen pogosto uporabljen nadomestek za bolj toksičen ksilen.

Gostota limonena je manjša od gostote vode, in sicer znaša 0,8411 g/mL, vrelišče limonena pa je pri 176 °C. V vodi je zaradi nepolarnosti molekule netopen, topen pa je v organskih topilih, kot so tetraklorometan, kloroform, heksan in ogljikov disulfid. Limonen topi polistiren, zato je dobro naravno nadomestilo za aceton.

Je relativno stabilen terpen in ga lahko destiliramo, ne da bi pri tem razpadel; pri visokih temperaturah kljub temu razpade in tvori izopren. Uporablja se kot dišava v parfumi in čistilih ter razkužilih. Znan je kot naravni insekticid, uporabljamo ga tudi za nadomestek terpentina. Pri pripravi tkiv za histološke preiskave ga uporabljamo kot nadomestek ksilena (Ahtik, Užmah, 2018).



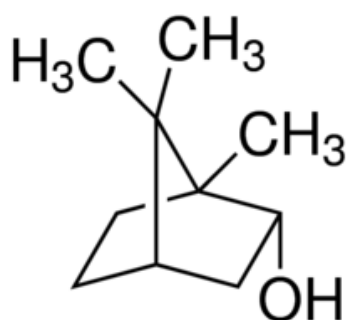
Slika 1: Izomerni strukturi limonena (Naturstoffe & Forschung, 2020)

2.6 BORNEOL

Borneol je monoterpenski alkohol (sestavljeno iz dveh molekul izoprena) z molekulsko formulo $C_{10}H_{18}O$. Njegovo ime po IUPAC sistemu je 1,7,7-trimetilbicyklo [2.2.1] heptan-2-ol. Čeprav ima zgolj eno hidroksilno funkcionalno skupino, je zaradi svoje zgradbe nepolaren. Sestavljen je namreč iz dveh med seboj povezanih ogljikovodikovih obročev (bicyklična spojina). V naravi obstajata dva borneolova enantiomera (optična izomera – razlika v smeri vrtenja linearno polarizirane svetlobe); L-(-)-borneol in D-(+)-borneol. Pri normalnih pogojih se borneol nahaja v obliki delno prozornih, belih kristalov z močnim vonjem po kafri in smrekovi smoli. V vodi je zaradi svoje nepolarosti razmeroma netopen, dobro je topen v etrih in sorodnih nepolarnih topilih, kot so kloroform, toluen, *n*-heksan in diklorometan. Ima višjo gostoto v primerjavi z vodo, točka vrelišča se nahaja pri 212 °C, tališča pri 202 °C in temperatura vžiga oz. plamenišče pri 60 °C. Zaradi vnetljivosti se lahko vname že s trenjem ali toploto. Odtok iz obvladovanja požara lahko povzroči onesnaženje okolja. Ob gorenju lahko nastajajo dražilni in strupeni plini. Stik z borneolom v tekoči ali plinasti obliki lahko povzroči hude opekline kože in oči. Pri vdihavanju visokih koncentracij borneola se lahko pojavijo glavobol, slabost, bruhanje, omotica in izguba zavesti. Poleg naštetega se lahko pojavijo tudi težave s koncentracijo, nemir, razdražljivost in epileptični napadi (Gril, Šivavec, 2019).

Borneol, sprva poznan kot borneokamfor, je leta 1842 poimenoval francoski kemik Charles Frédéric Gerhardt. Ime je dobil prav zaradi povezave s kafro. Kafro so sicer že dolgo pred tem poznali in uporabljali domorodci na otoku Borneo v Indoneziji, saj je bila zelo dragocena surovina, zato so z njo trgovali s Kitajci in z Indijci. Borneol se pojavlja v več kot 260 rastlinah in začimbah, kot so timijan, muškatni orešček, sivka in ingver, prisoten je tudi v eteričnih oljih lupin agrumov. Je organska spojina, ki jo lahko najdemo v eteričnih oljih vseh iglavcev, vendar se aktivno pridobiva predvsem iz tikovca *Dryobalanops aromitaca*, tako da v deblo drevesa naredijo luknjo in vanjo vstavijo pipo. Drevesni sok, ki priteče, nato ohladijo in tako dosežejo, da se strdi v kristalinično snov. Borneol so odkrili tudi v žlezah za markacijo ozemlja, ki jih imajo bobri.

Omenjena spojina je sestavni del mnogih eteričnih olj in je naravni repelent proti insektom. V organski kemiji ga pogosto uporabljajo za sintezo estrov, kafe, vse bolj pa je znan kot tako imenovani ligand v (asimetrični) organski sintezi. V medicini se borneol uporablja kot sredstvo za lajšanje bolečin pri artritisu, revmi, hemoroidih, zvinih, krčih in podobno. V preteklosti so ga veliko uporabljali v kitajski tradicionalni medicini, danes pa ga v medicini izkoriščajo predvsem za zdravljenje oz. preprečevanje bolezni srca in ožilja (antikoagulacijske lastnosti), lajšanje kašlja, spodbujanje cirkulacije in proizvodnje želodčnih sokov ter za zmanjševanje oteklin. V prehranski industriji borneol uporabljajo kot ojačevalec okusa predvsem v pekovskih izdelkih, pudingih, zamrznjenih mlečnih izdelkih ter trdih in mehkih sladkarijah. Uporabljajo ga tudi za izdelavo parfumov, ki so del osvežilcev zraka, detergentov, mil in drugih produktov za čiščenje (Gril, Šivavec, 2019).



Slika 2: Struktura (-)-borneola (Merck, 2020)

2.7 MACERACIJA

Pogosto učinkovine iz naravnih materialov izoliramo s pomočjo ekstrakcije. Ekstrakcija je metoda, s katero izločamo komponente iz trdne snovi oz. tekoče faze v drugo tekočo fazo s pomočjo topila. Ekstrakcija »trdno–tekoče« oz. maceracija temelji na topnosti spojin v ekstrakcijskem topilu, ekstrakcija »tekoče–tekoče« na osnovi topnosti spojine v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata. Topnost neke spojine je odvisna od tega, v kolikšni meri so njene

molekule sposobne tvoriti vezi s topilom. Polarne spojine so praviloma dobro topne v polarnih topilih, nepolarne spojine v nepolarnih topilih. Ekstrakcijo »tekoče–tekoče« uporabljamo, kadar ni mogoča destilacija oz. rektifikacija zaradi premajhne razlike v temperaturah vrelišča, tvorbe azeotropnih snovi in pri ločevanju temperaturno neobstoje snovi (vitamini, antibiotiki, aromatske snovi in drugo). Navadna ekstrakcija oz. maceracija poteka v treh stopnjah:

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

Ekstrakcijo z organskimi topili uporabljamo pri rastlinskih snoveh, ki so termolabilne in pri destilaciji z vodno paro ne dajejo eteričnega olja. Pri omenjeni tehniki lahko uporabljamo čista organska topila ali njihove mešanice. Rastlinski material namočimo v organskem topilu in odstranimo topilo pri znižanem tlaku. Dobimo preostanek, ki vsebuje poleg izluženih komponent tudi naš produkt.

V svetu kemijske tehnologije razvijajo postopke s pomočjo superkritičnih medijev. Ekstrakcija s superkritičnimi plini je sodobna metoda, ki je zaradi nizke temperature ekstrakcije primerna za termolabilne snovi. Izvedemo jo z utekočinjenimi plini (npr. ogljikovim dioksidom). V superkritičnem stanju imajo odlične lastnosti topila za organske molekule. Prednost te tehnike je, da dobimo produkte, ki so visoke kakovosti, saj ne vsebujejo zaostalih topil (Hohkraut, Zupanc Rezec, 2019).

Metoda, podobna destilaciji z vodno paro, se imenuje hidrodifuzija in je hitrejša in preprostejša. Para pronica navzdol skozi rastlinski material in ekstrahirano eterično olje, para kondenzira na enak način kot pri parni destilaciji. Ekstrakcija sestoji iz dveh zaporednih operacij. V prvi spravimo zmes v intenziven stik s topilom, v drugi obe fazi ločimo. Ekstrakcijo večinoma uporabljamo za pridobivanje olj iz plodov semen in za pridobivanje arom, farmacevtskih substanc rastlin in sadežev ter začimb. Kot topilo uporabljamo hlapna organska

topila, v določenem primeru tudi vodo. Izbira opreme za ekstrakcijo in obratovalni pogoji so odvisni od deleža in porazdelitve topne komponente v materialu, narave trdne snovi in velikosti delcev. Če je topljenec enakomerno dispergirani v trdni snovi, poteka raztapljanje najprej na površini, potem mora topilo penetrirati skozi zunanji sloj v notranjost delca, preden doseže topljenec. Hitrost ekstrakcije se zaradi opisanega zmanjša. Če je delež topljenca v trdnem materialu velik, lahko zaradi prevelike poroznosti pride do zdrobitve strukture v fino nasutje netopnega preostanka, ki postane neprepusten za topilo (Hohkraut, Zupanc Rezec, 2019).

Splošno lahko proces razdelimo na tri stopnje. Prva je fazna sprememba pri raztapljanju topljenca, sledi difuzija topljenca v topilo, ki se nahaja v porah trdnega materiala, na površino delca. V zadnjem delu se vrši prenos topljenca skozi tekočinski film na površini delca v glavni tok topila. Katera koli izmed teh stopenj lahko omejuje ekstrakcijsko hitrost, ponavadi prvi proces poteče tako hitro, da je njegov vpliv na ekstrakcijsko hitrost zanemarljiv.

Za dobro ločitev faz po ekstrakciji je pomembna razlika v gostotah osnovnega in ekstrakcijskega topila in netopnost enega v drugem. Uspešnost ekstrakcije ugotovimo iz izračuna suhe snovi ali iz porazdelitvenega koeficienta k . Nernstov porazdelitveni koeficient k je razmerje ravnotežnih koncentracij komponente v topilu 1 (c_1) in v topilu 2 (c_2).

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

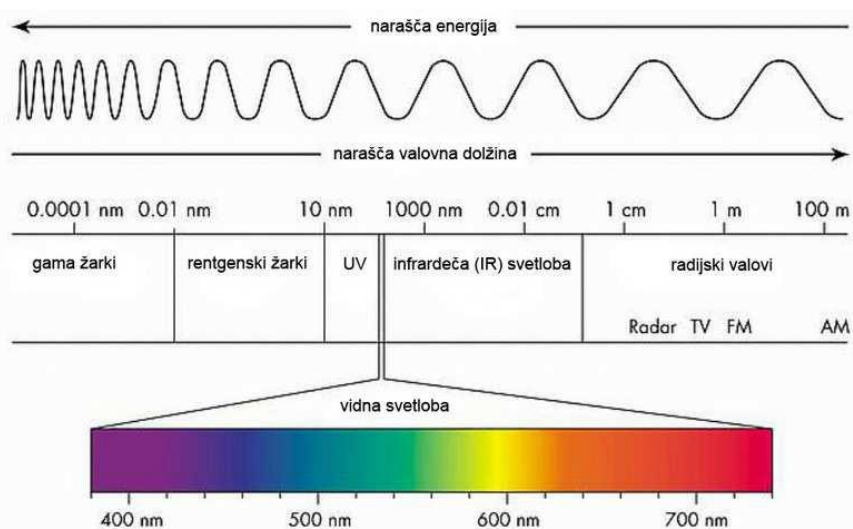
Velja zakonitost, da večji kot je k , uspešnejša je ekstrakcija (Hohkraut, Zupanc Rezec, 2019).

2.8 IR-SPEKTROSKOPIJA

Infrardeča spektroskopija (IR-spektroskopija ali vibracijska spektroskopija) je spektroskopska metoda, pri kateri opazujemo interakcijo infrardeče svetlobe s

snovjo. Del spektra resonančno vzbudi nihanja atomov v molekuli, s čimer pride do absorpcije svetlobe.

IR-absorpcijska spektroskopija temelji na analizi spektra, ki ga dobimo, če vzorec presvetlimo z elektromagnetnim valovanjem z valovnimi dolžinami IR-območja. Absorpcija IR-svetlobe vzpodbudi vibracijska stanja absorbirajočih molekul. Na dobljenem spektru opazimo, da se po prehodu skozi vzorec intenziteta dela originalnega sevanja zmanjša. Knjižnice IR-spektrov številnih spojin nam služijo kot orodje pri določevanju spojin neznanih vzorcev. Vsak trak v posnetem IR-spektru je posledica določenega nihanja molekulskih skupin. Znano je, da imata dva polimera z enako strukturo enak IR-spekter. Dobljene IR-spektre neznanih vzorcev zato primerjamo z IR-spektri znanih spojin. Fotoni infrardečega sevanja z valovnimi dolžinami od 700 nm do 1 mm imajo dovolj veliko energijo, da vzbudijo nihanja atomov v molekulah. Atomi v molekulah lahko nihajo na več načinov: vzdolžno, simetrično, asimetrično in prečno. Število močnih nihanj narašča z velikostjo molekule, zato so lahko IR-spektri velikih molekul zelo zapleteni in je tako skoraj nemogoče določiti, kateremu nihanju ustreza določen absorpcijski trak. V IR-spektrih se največkrat uporablja namesto valovne dolžine valovno število (ν), ki je recipročna vrednost valovne dolžine, izražena v cm^{-1} (Hohkraut, Zupanc Rezec, 2019).



Slika 3: Shematski prikaz spektra elektromagnetnega valovanja (Svetila LED, 2013)

Pri najvišjih frekvencah (visokih valovnih številih) bodo absorbirale skupine z lahкими atomi, ki so povezane z močnimi vezmi. Najlažji atom je vodik, ki je v organskih spojinah vezan na ogljik, kisik ali dušik, redkeje na žveplo. S temi 30 atomi tvori močne vezi, ki imajo absorpcijske trakove pri visokih valovnih številih. Vezi C-C, C-O, C-N, C-halogen in druge imajo nižje lastne frekvence, nekoliko višje dvojne in trojne vezi (C=O, CC, CN), saj so te vezi tudi močnejše. Posamezni tipi vezi oziroma funkcionalnih skupin imajo absorpcijske trakove v točno določenih območjih spektra, kar nam omogoča, da lahko z IR-spektra sklepamo na prisotnost ustrezne funkcionalne skupine oziroma strukturnega elementa v molekuli. Območje v spektru, v katerem ugotavljamo prisotnost funkcionalnih skupin, sega od 4000 do 1600 cm^{-1} ; območje pod 1600 cm^{-1} imenujemo območje prstnega odtisa, ki je uporabno predvsem za identifikacijo spojin. Samo identični spojinata imata namreč tudi ta del spektra povsem enak, če sta bila spektra posneta v enakih okoliščinah.

Vezi ogljik-vodik so prisotne v skoraj vseh organskih molekulah. Osnovne frekvence imajo v dveh območjih, in sicer med 2500 in 3300 cm^{-1} ter med 650 in 1550 cm^{-1} . Atomi vodika, vezani na sp^3 -hibridizirane ogljikove atome (alkani), imajo absorpcijske trakove med 2800 in 3000 cm^{-1} ter med 1200 in 1500 cm^{-1} . Metilne skupine (-CH₃) imajo navadno dva močna absorpcijska vrhova pri 2872 in 2962 cm^{-1} ter enega nekoliko šibkejšega pri 1380 cm^{-1} . Metilenske skupine (-CH₂-) kažejo močne absorpcijske signale pri 2853, 2926 in 1460 cm^{-1} . Metinska skupina (-CH-) ima en sam šibek absorpcijski signal pri 2890 cm^{-1} .

Prisotnost določenih funkcionalnih skupin v molekuli ne določimo samo iz položaja traku, ampak tudi iz oblike in intenzitete signala. Tehnika IR-spektroskopije se uporablja tudi v farmaciji, medicini (npr. za določanje količine telesne maščobe – BMI), kriminalistiki (npr. za analizo vlaken), prehrani (npr. za določanje vsebnosti vode v mlevskih izdelkih), agrikulturi, okoljevarstvu in podobno. Med drugim z IR-spektroskopijo določajo tudi starost lesenih umetniških predmetov (Tomšič in sod., 2007), (Hohkraut, Zupanc Rezec, 2019) (Nemeček, 2011).

S pomočjo IR-spektrov dobimo informacijo o vrsti materiala. Velika uporabna prednost IR-spektroskopije kot analizne metode je, da metoda sama ni destruktivna (neporušna), omogoča delo z vzorci vseh agregatnih stanj, je hitra in enostavna (Hohkraut, Zupanc Rezec 2019).

2.9 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA

Cilj raziskovalnega dela je bil proučiti pripravo macerate iglic navadne smreke (*Picea abies*) z ekstrakcijo »trdno – tekoče«. Maceracijo bomo izvedli na dveh vzorcih iglic, ki bosta izvirala z zdrave in z bolne smreke, ki je bila okužena s podlubniki. Postopek bomo izvajali s pomočjo organskih topil (etanol, triklorometan in petroleter) treh različnih polarnosti in preučili njihov vpliv na količino pridobljenega ekstrakta. V nadaljevanju bomo s pomočjo kvantitativne IR-spektroskopije, tehnike FTIR, določili količinsko vsebnost limonena in borneola. Podali bomo poročilo o vplivu podlubnikov na vsebnost omenjenih učinkovin v iglicah navadne smreke. Ugotovitve bodo prispevale k pomembnemu poznavanju kakovosti naravnega materiala in morebitne kontrole kakovosti s hitro in enostavno analitsko metodo. V delu pa vidimo predvsem idejo po iskanju zdravih učinkovin naravnega izvora, saj je kemija naravnih spojin cenjena že vse od začetka razvoja naravoslovnih znanosti.

2.10 HIPOTEZA

Po preučenih teoretičnih izhodiščih smo si postavili hipotezo, ki nas je kot osnovni motiv vodila skozi celotno raziskovanje.

Predvidevamo, da je s pomočjo FTIR-spektroskopije možno kvantitativno določiti vsebnost limonena in borneola v maceratih navadne smreke (*Picea abies*). Določene vrednosti se bodo razlikovale glede na posamezni tip uporabljenega topila.

Predvidevamo, da bodo količinske vsebnosti limonena, ki je naravni insekticid, v maceratih iglic kontaminirane smreke s podlubniki višje kot pri vzorcih zdrave smreke. Prav pri maceratih iglic zdrave smreke predvidevamo, da bo, splošno gledano, vsebnost borneola višja kot pri s podlubniki oboleli smreki. Višjo vsebnost borneola bomo lahko zaznali že ob vonjanju rastlinskega materiala.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 UVOD

Pri izvajanju eksperimentov je pomembno, da pozornost usmerimo v čistost uporabljenih reagentov, delovnih aparatov, inventarja in delovnega prostora. Posebno pozornost namenimo zaščiti posameznika. Nosimo zaščitno opremo – haljo, očala in rokavice. V laboratoriju potrebujemo poleg steklenih posod in aparatov tudi droben stekleni inventar: palčko za mešanje, kapalko za dodajanje tekočin, žličko za tehtanje in podobno. Nekateri reagenti so zdravju škodljivi in nevarni, zato je potrebno z njimi ravnati v skladu s priloženimi navodili.

Vse podrobnosti o kemikalijah so predstavljene v dodatku.

3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE

- Maceracijska topila

Pri posameznem topilu navajamo še dielektrično konstanto (ϵ), ki predstavlja merilo polarosti posameznega topila (Smallwood, 1996).

a) Etanol (absolutni, Sigma-Aldrich), C_2H_5OH , $\epsilon = 22,4$

b) Triklorometan ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), $CHCl_3$, $\epsilon = 4,8$

c) Petroleter (ACS reagent, Sigma-Aldrich), $\epsilon = 1,844$

- (R)-(+)-Limonen (analitski standard, Sigma-Aldrich)
- (S)-(-)-Limonen (analitski standard, Sigma-Aldrich)
- (+)-Borneol (analitski standard, Sigma-Aldrich)
- (-)-Borneol (analitski standard, Sigma-Aldrich)

3.3 APARATURE IN INVENTAR

APARATURE

- precizna laboratorijska tehtnica Kern 440-47
- analizna tehtnica Kern & Sohn GmbH, ABJ 120-4M
- laboratorijski stresalnik Ika, KS250 basic
- enodelni štedilnik Clatronic, EKP 2419
- mikrovalovna pečica Midea, tip MG7017NP-BM
- sušilnik sadja ECG, SO 570
- hladilnik Gorenje, RB4061AW367180
- rotacijski uparjalnik, IKA™ RV 10 Digital V Rotary Evaporator
- aparatura za FTIR-spektroskopijo, Tensor 27, Bruker



Slika 4: Aparatura za FTIR-spektroskopijo (Fotografija last avtorice)

INVENTAR

- erlenmajerica, 500 mL, 20 kosov
- erlenmajerica, 100 mL, 60 kosov
- čaša, 100 mL, 60 kosov
- merilni valj, 100 mL, 40 kosov

- merilni valj, 10 mL, 40 kosov
- steklena palčka, 16 kosov
- kvalitativni lij, 16 kosov
- spatula, 2 kosa
- plutasti zamaški, 60 kosov
- steklena kapalka, 5 kosov
- kovinski lonec, 1 kos
- termometer, 1 kos
- laboratorijsko stojalo, 8 kosov
- kovinski obroč, 8 kosov
- mufa in prižema, 8 kosov
- pinceta, 1 kos

3.4 PRIPRAVE VZORCEV

Zdrava smreka je bila posekana 15. novembra v Mišjem dolu (Katastrska občina Jurklošter). Njena parcelna številka je 223/22. Stara je bila 130 let.



Slika 5: Štor zdrave smreke (Fotografija last avtorice)

Bolna smreka je bila prav tako posekana 15. novembra v Globokem (Katastrska občina Jurklošter). Njena parcelna številka je 475/2. Stara je bila 117 let.



Slika 6: Štor bolne smreke (Fotografija last avtorice)

Z vej obeh smrek smo ločili iglice. Vsebinski zbranih iglic (zdrave in bolne smreke) smo v sušilniku sušili 9 ur pri temperaturi 35 °C. Rastlinski material smo po sušenju shranili v plastične vsebnike in jih neprodušno zaprli.



Slika 7: Veje z iglicami zdrave smreke (Fotografija last avtorice)



Slika 8: Iglice bolne smreke (Fotografija last avtorice)



Slika 9: Sušenje iglic v sušilniku (Slika last avtorice)

3.5 PRIPRAVA MACERATOV NAVADNE SMREKE

V 500 mL erlenmajerice smo zatehtali 10,0 g posušenih iglic zdrave in bolne navadne smreke. Zatehti smo dodali 100 mL maceracijskega topila (etanola, triklorometana, petroletra) in vsebino stresali na stresalniku pri 250 obratih na minuto: v prvi paralelki eno uro, v drugi 24 ur in v tretji točno 7 dni (168 ur). Po pretečenem času vsebino filtriramo. Trdni rastlinski preostanek speremo s 3 × 15 mL topila in vsebino kvantitativno prenesemo v stehtano bučko. Topilo odparimo pod znižanim pritiskom in preostanek stehtamo. Količino izoliranega materiala določimo z odštevanjem mase bučke z maceratom in predhodno stehtane (prazne) bučke. Izolirani material do izvedbe analize hranimo v neprodušno zaprti bučki v hladilniku na temperaturi 5 °C.

Maceracija pri povišani temperaturi 52 °C je potekala po enakem sosledju zgoraj navedenih korakov, ob konstantnem mešanju in nadzoru temperature kopeli. Na vodni kopeli smo eno uro macerirali rastlinski material pri temperaturi 50 °C.

Predhodne maceracije so potekale na »sobni/delovni temperaturi« oz. temperaturi prostora, ki je znašala 22 °C.



Slika 10: Potek maceracije (Fotografija last avtorice)

3.6 KVANTITATIVNA DOLOČITEV LIMONENA IN BORNEOLA V MACERATIH NAVADNE SMREKE Z UPORABO FTIR-SPEKTROSKOPIJE

FTIR-spektre smo posneli na Brukerjevem FTIR-vibracijskem spektrometru Tensor 27 in Specacovi Golden gate ATR (*angl.* Attenuated total reflection, *slo.* metoda oslabiljenega popolnega odboja) celici z diamantnim kristalom in enim odbojem. Spektri so bili posneti v območju med 4000 in 600 cm^{-1} . Vsak končni spekter je bil povprečno iz 64 posameznih spektrov, s čimer smo izboljšali spektralno razmerje med signalom in šumom. Od vsakega končnega spektra je bil samodejno odštet spekter ozadja, za katerega smo uporabili enake meritvene parametre. Kvantitativna ocena deleža limonena in borneola v izolatih je bila določena z odštevalnim faktorjem, pridobljenim z odštevanjem spektra čistega limonena in borneola od spektra posameznega izolata.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 REZULTATI MACERACIJE IGLIC ZDRAVE IN BOLNE NAVADNE SMREKE

Rezultate maceracij limonena in borneola iz navadne smreke prikazuje spodnja tabela.

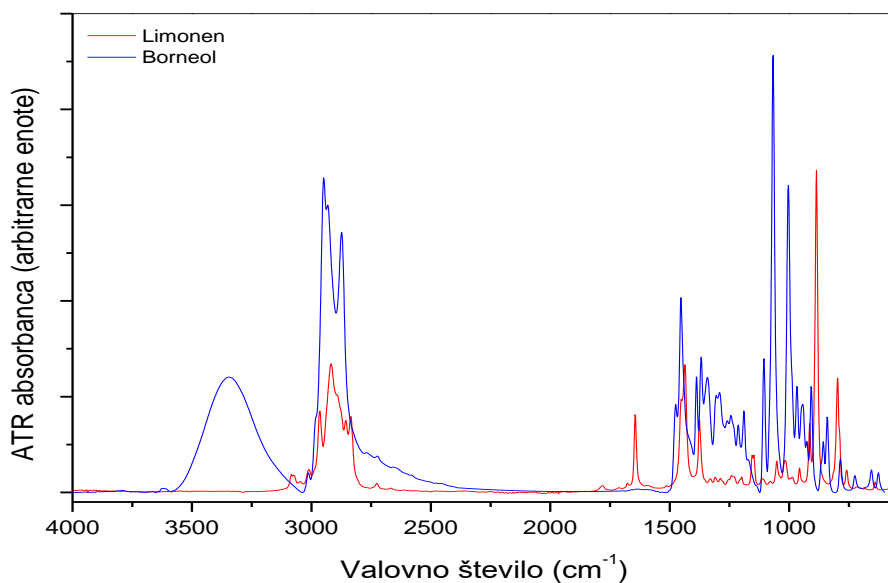
TIP VZORCA NAVADNE SMREKE	ČAS MACERACIJE (h)	TEMPERATURA (°C)	TOPILO	KOLIČINA MACERATA (mg)
ZDRAVA	1	22	etanol	223
			triklorometan	192
			petroleter	154
BOLNA	1	22	etanol	219
			triklorometan	201
			petroleter	165
ZDRAVA	24	22	etanol	352
			triklorometan	166
			petroleter	138
BOLNA	24	22	etanol	241
			triklorometan	141
			petroleter	134
ZDRAVA	168	22	etanol	713
			triklorometan	255
			petroleter	201
BOLNA	168	22	etanol	461
			triklorometan	329

			petroleter	310
ZDRAVA	1	50	etanol	334
			triklorometan	242
			petroleter	166
BOLNA	1	50	etanol	414
			triklorometan	251
			petroleter	144

Tabela 1: Količine pripravljene macerata

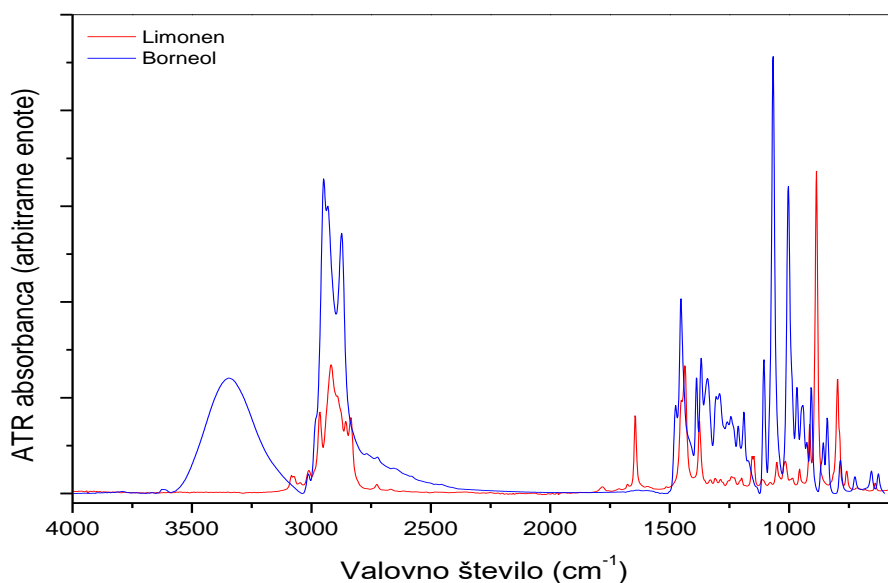
Tabela prikazuje količino macerata po izolaciji glede na pogoje izolacije in tip vzorca (zdrava, bolna smreka). V splošnem lahko rečemo, da smo največjo količino izolata pridobili z uporabo etanola, sledi mu triklorometan in nato petroleter. Podoben trend lahko povežemo z dielektrično konstanto. Etanol je od vseh treh topil najbolj polaren in smo z njim pridobili mnoge učinkovine, ki so v njem topne. Najmanjšo količino izolirane mase lahko pripišemo nizki polarnosti petroletra (najnižja dielektrična konstanta), saj smo z njim predvidoma pridobili zgolj nepolarne učinkovine. Zavedamo se, da pripravljen material v vseh topilnih sistemih ni kemijsko čist (ena snov), temveč predstavlja mešanico komponent, ki so topne pod ustreznimi pogoji v uporabljenem topilu. Če bi želeli pripraviti čiste snovi, bi morali izvesti postopek separacije oz. ločbe. Opazimo tudi, da prav tako na količino macerata pomembno vpliva čas maceracije. Dlje časa kot je material v stiku s topilom, večja je masa macerata. Na tem mestu lahko omenimo, da smo v zdravi smreki, v etanolu, po enem tednu (168 h) pridobili največ macerata. Postopek smo izvajali tudi pri povišani temperaturi (52 °C), saj smo bili mnenja, da bi s toplotnim šokom uspeli »odpreti« pore v iglicah. Predvsem je pomembno vedeti, da je zunanji sloj iglice sestavljen iz tanke plasti nepolarnih snovi (lipidne komponente), ki jih je potrebno odtopiti, da lahko topilo deluje v notranjost materiala. To nam je z vidika vizualnega pogleda uspelo, saj je bila raztopina, ki je bila v stiku z rastlinskim materialom, občutno bolj obarvana kot tista, ki smo jo imeli na sobni temperaturi (22 °C). Posledično je imel tudi macerat temnejši odtenek.

4.2 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČITEV LIMONENA IN BORNEOLA S FTIR-SPEKTROSKOPIJO



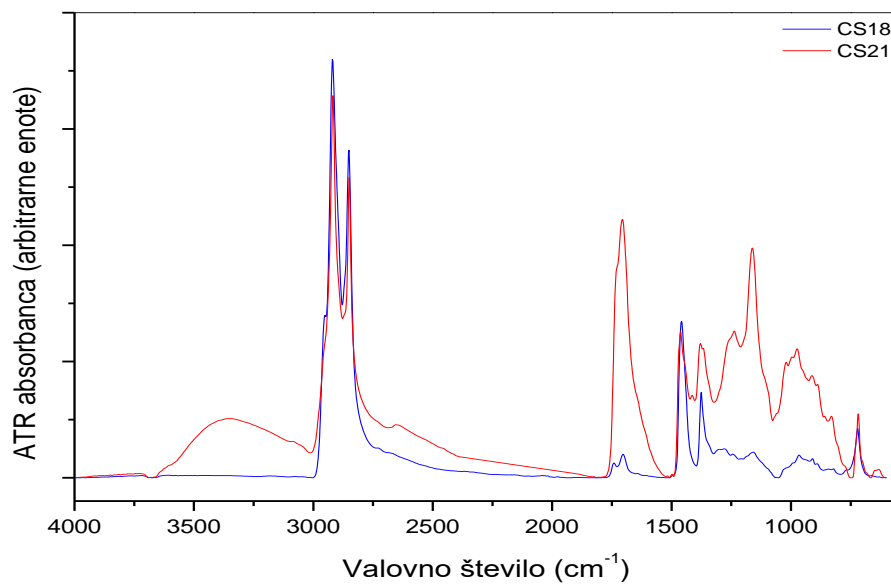
Graf 1: Spekter standardnega limonena in standardnega borneola

Kvantitativna ocena deleža limonena in borneola v izolatih je bila določena z odštevalnim faktorjem, pridobljenim z odštevanjem spektra čistega limonena in borneola od spektra posameznega izolata. Pri odštevanju smo kot indikator za limonen uporabili traka pri 1644 cm⁻¹ in 886 cm⁻¹. Trak pri 1644 cm⁻¹ pripišemo valenčnemu nihanju cikličnih C=C skupin. Trak pri 886 cm⁻¹ pripada valenčnemu nihanju C-H skupin v cikloheksenskem obroču. Kot indikator za borneol smo uporabili traka pri 1068 in 1004 cm⁻¹, ki se nahajata v območju C-O valenčnega nihanja.

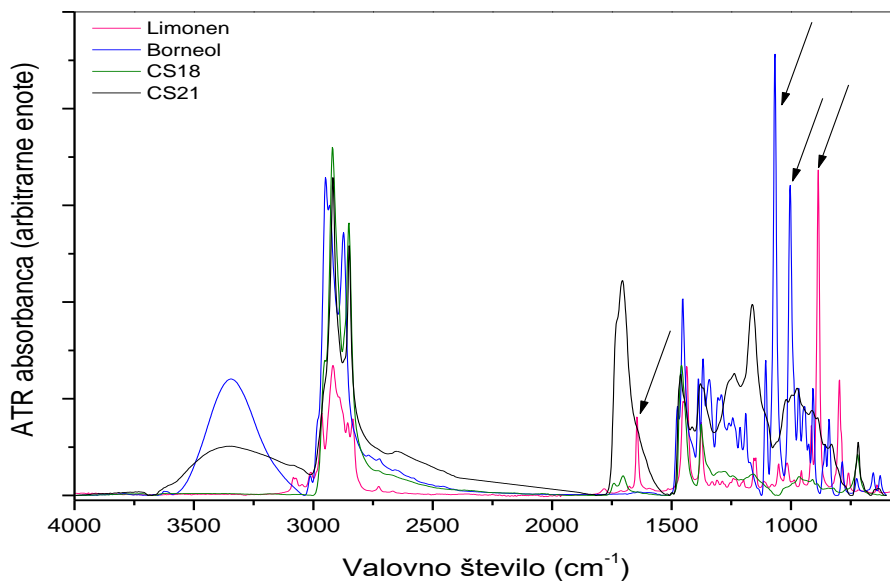


Graf 2: FTIR spektra standardnega limonena (rdeče barve) in standardnega borneola (modre barve).

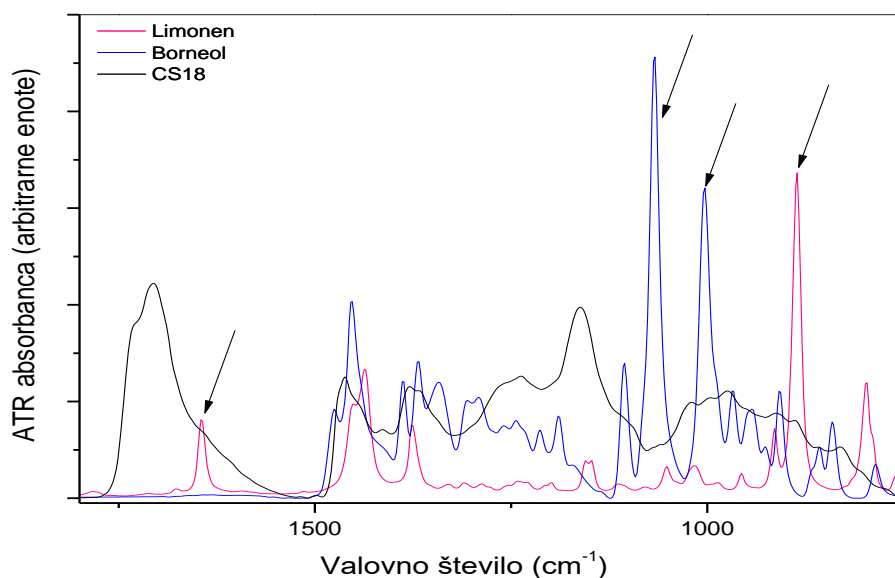
Kvantitativna ocena deleža limonena in borneola v izolatih je bila določena z odštevalnim faktorjem, pridobljenim z odštevanjem spektra čistega limonena in borneola od spektra posameznega izolata. Pri odštevanju smo kot indikator za limonen uporabili traka pri 1644 cm⁻¹ in 886 cm⁻¹. Trak pri 1644 cm⁻¹ pripišemo valenčnemu nihanju cikličnih C=C skupin. Trak pri 886 cm⁻¹ pripada valenčnemu nihanju C-H skupin v cikloheksenskem obroču. Kot indikator za borneol smo uporabili traka pri 1068 in 1004 cm⁻¹, ki se nahajata v območju C-O valenčnega nihanja.



Graf 3: FTIR spektra dveh izolatov, ki pričata o raznovrstni sestavi posameznih izolatov.



Graf 4: FTIR spektri limonena (rdeče barve), borneola (modre barve) in dveh posameznih izolatov (zelena in črna barva). Delež limonena in borneola smo določili z odštevanjem spektrov limonena in borneola od spektrov izolatov do točke, ko na spektrih izolatov nismo več videli trakov, ki pripadajo limonenu in borneolu. Pri odštevanju smo se oprli na najintenzivnejše trakove limonena in borneola, na grafu 3 označene s puščicami.



Graf 5: FTIR spektri limonena (rdeče barve), borneola (modre barve) in dveh posameznih izolatov (zelena in črna barva) v regiji prstnega odtisa. Pri odštevanju smo kot indikator za limonen uporabili trakova pri 1644 cm^{-1} in 886 cm^{-1} . Trak pri 1644 cm^{-1} pripišemo valenčnemu nihanju cikličnih C=C skupin. Trak pri 886 cm^{-1} pripada valenčnemu nihanju C-H skupin v cikloheksenskem obroču. Kot indikator za borneol smo uporabili trakova pri 1068 in 1004 cm^{-1} , ki se nahajata v območju C-O valenčnega nihanja.

V spodnji tabeli predstavimo delež limonena in borneola v analiziranih vzorcih s pomočjo FTIR-spektroskopije.

TIP VZORCA NAVADNE SMREKE	ČAS MACERACIJE (h)	TEMPERATURA (°C)	TOPILO	VSEBNOST LIMONENA (%)	VSEBNOT BORNEOLA (%)
ZDRAVA	1	22	etanol	n. d.	3,0
			triklorometan	1,0	1,5
			petroleter	1,5	0,5
BOLNA	1	22	etanol	n. d.	n. d.
			triklorometan	1,5	1,0
			petroleter	2,0	n. d.
			etanol	2,0	3,0

ZDRAVA	24	22	triklorometan	1,5	1,5
			petroleter	2,5	0,5
BOLNA	24	22	etanol	n. d.	2,0
			triklorometan	2,5	1,0
			petroleter	2,0	1,0
ZDRAVA	168	22	etanol	2,0	4,5
			triklorometan	1,5	2,0
			petroleter	2,5	0,5
BOLNA	168	22	etanol	6,0	4,5
			triklorometan	4,0	1,0
			petroleter	2,0	1,0
ZDRAVA	1	50	etanol	n. d.	4,0
			triklorometan	1,0	1,0
			petroleter	2,5	0,5
BOLNA	1	50	etanol	0,5	1,0
			triklorometan	1,0	1,0
			petroleter	2,0	0,5

Tabela 2: Rezultati vsebnosti limonena in borneola v maceriranih vzorcih

V splošnem velja, da z večanjem časa maceracije izoliramo večjo vsebnost izolirane komponente. V nekaterih primerih kvantitativnih vrednosti iskanih komponent nismo podali, saj jih instrument ni zaznal. Z gotovostjo ne moremo trditi, da iskane učinkovine ni, saj ima vsak instrument svoje območje zaznave (oz. strokovno mejo zaznave/detekcije). Na tamkajšnjih mestih smo označili »n. d.« kar pomeni, da je bila količina substance pod mejo zaznave aparata (*angl.* not detected). Vsekakor je eksperimentalni rezultat v skladu z začetnim predvidevanjem, saj imamo opravka z realnim (naravnim) vzorcem, kjer vsebnosti variirajo. Z nadaljnjim postopkom maceracije skozi daljše časovno obdobje je moč opaziti večanje % vsebnosti iskane substance. Najintenzivnejši dokaz za omenjeno trditev lahko opazimo pri maceriranju s podlubniki

okuženega (bolnega) vzorca, ki smo ga macerirali v triklorometanu. Vsebnost limonena je linearno rasla s časom: po 1 uri smo ga izolirali 1,5 %, po 24 h 2,5 % in po enem tednu (168 h) 4,0 %. V vzorcih, kjer je bila po določenem času vsebnost konstantna, nadaljnji čas obdelave vzorca v topilu nima vpliva na večanje vsebnosti. Tak primer je maceriranje zdravega vzorca v etanolu. Po eni uri ne zaznamo vrednosti limonena, nato smo ga po 24 urah izolirali 2,0 %. Po enem tednu izpostavitve materiala topilu nadaljnjega povečanja ni bilo moč zaznati.

Iz izmerjenega velja omeniti, da na postopek maceracije vpliva tudi temperatura. Pri povišani temperaturi v nekaterih primerih pripravimo z učinkovinami bolj bogat izolat. Omenjeno opazimo pri enournem maceriranju vzorca zdrave smreke v petroletru. Vsebnost limonena pri sobni temperaturi je znašala 1,5 %, ko smo vzorec izpostavili 30 °C višji temperaturi, pa smo izolirali 2,5 % limonena.

Podobna nihanja v sestavi macerata, kot smo jih navedli za limonen, lahko opazimo pri borneolu. Njegova vsebnost od enournega maceriranja v etanolu in triklorometanu vse do enega tedna izpostavitve pri sobni temperaturi narašča oz. je pri določeni (vmesni) časovni enoti že dosegel svoj vrh izluževanja. Navrženo trditev najbolje opiše poskus maceracije bolnega vzorca iglic v etanolu. Po enournem maceriranju na sobni temperaturi borneola nismo zaznali, nato pa smo po 24 urah določili njegovo vsebnost 2,0 %, katera se je po 1 tednu dvignila na 4,5 %. Konstantno vsebnost borneola skozi celotno časovno skalo poteka opazimo pri maceraciji bolnega vzorca v triklorometanu. Njegova vsebnost je znašala 1 %. Maceracija je zaključena že po enurni izpostavitvi rastlinskega materiala topilu. Pri maceriranju vzorca iglic zdrave smreke v etanolu smo po 1 in 24 urah opazili konstantno vrednost, ki je znašala 3 %, po enem tednu pa smo v vsebini izolirali 4,5 % borneola.

Če vzorcu s sobne temperature dvignemo temperaturo za 30 stopinj Celzija, pri obeh tipih vzorcev opazimo povečanje vsebnosti borneola. Padec za 0,5 % opazimo zgolj pri vzorcu zdrave smreke, ki smo jo izpostavili triklorometanu.

Razlog za omenjeno pripisujemo morebitni eksperimentalni napaki, možne pa bi bile tudi kakšne razpadne reakcije v sami mešanici. Kemija spojin, kot je borneol, ima mnoge zapletene lastnosti, ki jih bomo spoznali v kasnejših letih izobraževanja. Vsekakor so te spojine nagnjene k »pre-strukturiranju oz. preoblikovanju« v druge spojine. Ker pa imamo kompleksno mešanico naravnega vzorca, je na tej stopnji težko razložiti stanje.

5. ZAKLJUČEK

V raziskovalnem delu smo predvidevali, da bomo s pomočjo FTIR-spektroskopije kvantitativno določili vsebnost limonena in borneola v maceratih navadne smreke (*Picea abies*). Trditev lahko potrdimo, saj smo po uspešni izolaciji še uspešno določili kvantitativno vsebnost obeh učinkovin. Vsebnosti so se razlikovale glede na uporabljeno vrsto vzorca, tip topila, časovno komponento trajanja maceracije in temperature. Rezultati kvantitativnih določanj pričajo o nizkih vsebnostih komponent v maceratih. V nadaljevanju bi bilo potrebno poleg FTIR-spektroskopije vsekakor uporabiti še neko neodvisno metodo, s katero bi se dodatno prepričali v točnost rezultata. Na tej stopnji je FTIR-spektroskopija služila kot primer hitre in za rokovanje razumljive metode dela, čeprav se zavedamo, da za omenjenimi signali temeljijo mnoga fizikalna in matematična znanja, ki jih posameznik osvoji zgolj, če se za tehniko popolnoma specializira. Veseli smo, da smo imeli priložnost sodelovati s takšnim osebjem in od blizu spoznati tovrstni svet analizne kemije.

V delu smo predvidevali tudi, da bodo količinske vsebnosti limonena, ki med drugim velja za naravni insekticid, v maceratih iglic kontaminirane smreke s podlubniki višje kot pri vzorcih zdrave smreke. Izhajali smo iz lastnosti limonenovih insekticidnih lastnosti. Znano je, da se smreka bori proti podlubnikom s pomočjo smoljenja. V smoli so analitsko določili mnoge učinkovine, predvsem (mono)terpene, ki naj bi se sprostil ob vdoru podlubnikov v drevo. Slednje je bilo že opisano na modelu norveške smreke (Erbilgin in sod., 2007), (Zhao in sod., 2010). Predvidevamo, da je potencialno možno sklepati na rezultat v iglicah (absolutno v manjšem količinskem obsegu). Vsekakor je tu potrebno opraviti še morebitne raziskave t. i. biosintezne poti nastanka limonena, da bomo z gotovostjo potrdili predlagano. Omenjeno trditev glede kvantitativne analize limonena lahko potrdimo, saj smo ga, celostno gledano, največ izolirali prav iz iglic s podlubniki obolele smreke.

Uspešno topilo, ki je omogočalo pripravo macerata, je bil nepolarni petroleter. V določenih primerih se je v vzorcih, maceriranih z etanolom, pokazala za odtenek višja vsebnost, vendar smo mnenja, da smo s polarnim topilom izlužili še mnoge druge snovi (ki imajo morda soroden trak v IR-spektru). Morda je prišlo celo do separacije bornilacetata, ki je sicer sorodnik borneola, a je v tem topilu topen.

Prav pri maceratih iglic zdrave smreke smo predvidevali, da bodo vsebnosti borneola višje kot pri s podlubniki oboleli smreki. Vsebnost borneola smo lahko zaznali že ob vonjanju rastlinskega materiala, saj ima borneol (sorodnik kafe) zelo intenziven vonj, podoben vonj lahko zaznamo tudi pri bornilacetatu. S pomočjo meritev FTIR-spektroskopije smo pokazali, da je povečane vsebnosti borneola zaznati prav pri zdravi smreki. Od vseh maceratov smo najvišjo vrednost opazili v etanolnem maceratu po enem tednu na sobni temperaturi (4,5 %). Do 0,5 % manjše vsebnosti pridemo, če enourno maceracijo izvajamo pri 30 °C višji temperaturi. Iz rezultatov sledi, da je za pripravo maceratov, bogatih z borneolom, vredno uporabiti polarni etanol.

6. LITERATURA

Ahtik, G., Užmah, T. (2018). Preučevanje lastnosti cikličnega terpena in študij njegove vsebnosti v vzorcih, pripravljenih z maceracijo (Raziskovalno delo). Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško.

Biol, I., Raymond, A., Jackman, S. D., Pleasance, S., Coope, R., Taylor, G. A., Yuen, M. M., Keeling, C. I., Brand, D., Vandervalk, B. P., Kirk, H., Pandoh, P., Moore, R. A., Zhao, Y., Mungall, A. J., Jaquish, B., Yanchuk, A., Ritland, C., Boyle, B., Bousquet, J., Ritland, K., Mackay, J., Bohlmann, J., Jones, S. J. (2013). Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. *Bioinformatics*, 29, 12, 1492-14927.

Borštnik, B. (2015). Proučevanje sestave eteričnega olja mehiškega brina (*Juniperus Mexicana*), izolacija cedrola in olfaktorno vrednotenje (Diplomsko delo). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.

Brus, R. (2008). Navadna smreka. *Slovenski čebelar*. 110, 2, 57–59.

Caudullo, G., Tinner, W., de Rigo, D. (2016). *Picea abies* in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. V: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (ur.), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e012300+.

Chen, Y. K., Jeon, S. J., Walsh, P. J., Nugent, W. A. (2005). (2S)-(-)-3-exo-(morpholino)isoborneol, *Organic Syntheses*. Pridobljeno s: <http://www.orgsyn.org/demo.aspx?prep=v82p0087>

Crasto, A. (2019). Organic chemistry, Exo endo. Pridobljeno s: <https://sites.google.com/site/anthonycrastoorganicchemistry/exo-endo>

Durić, I. (2019). Izolacija eteričnih olj iz storžev, iglic in smole navadne smreke (*Picea abies*) in primerjava njihove sestave s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (Magistersko delo). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.

Erbilgin, N., Krokene, P., Kvamme, T., Christiansen, E. (2007). A host monoterpene influences *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) responses to its aggregation pheromone. *Agricultural and Forest Entomology*, 9, 135–140.

E-učbeniki. (2020). Kemija 9, Pridobivanje eteričnega olja v laboratoriju. Pridobljeno s: <https://eucbeniki.sio.si/kemija9/1114/index2.html>

Gjergjek, R. (2010). Lokalni odziv skupnih proteinov v lubju navadne smreke na tretiranje s salicilno kislino in napad podlubnikov (Diplomsko delo). Univerza v Mariboru, Fakulteta za Kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor.

Gozd in gozdarstvo (2012). Podlubniki. Pridobljeno s: <https://www.gozd-les.com/upravljanje-gozdov/tezave-gozdom/zuzelke/podlubniki>

Gril, M., Šivavec, J. (2019). Priprava ekstraktov navadne smreke (*Picea abies*), bogatih z aktivnim borneolom ter njihova aktivnost in delovanje na kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) (Projektno-raziskovalno delo). Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola Ljubljana, Ljubljana.

Hohkraut, S., Zupanc, Rezec, A. (2019). Kvantitativna vsebnost teobromina v ekstratih Navadne bodike (*Ilex aquifolium*) in njihovo delovanje na kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) (Raziskovalno delo). Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško.

Jurc, M. (2006). Navadna smreka – *Picea abies* (L.) Karsten: žuželke na deblih, vejah in v lesu. *Gozdarski vestnik*, 64, 1, 197-212.

Kasumović, L., Hrašovec, B., Jazbec, A. (2016). Efficiency of dry and wet flight barrier Theysohn® pheromone traps in catching the spruce bark beetles *Ips typographus* L. and *Pityogenes chalcographus* L. *Šumarski list*, (9–10), 477–484.

Kolman, M. A. (2017). Drevesa: miti, legende, zdravilnost, 2. del. Sebur, Ljubljana.

Majcen, B. (2012). Spoznavanje iglavcev v vrtcu (Diplomsko delo). Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta Ljubljana, Ljubljana.

Martinčič, A., Wraber, T., Jogan, J., Podobnik, A., Turk, B. (2010). Mala flora Slovenije: Ključ za določanje praprotnic in semenk. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana.

Merck. (2020). Borneol. Pridobljeno s <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/139114?lang=en®ion=SI>

Merck. (2020). Varnostni list v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006, L-bornyl acetate for synthesis. Pridobljeno s https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-PL-Site/pl_PL/-/PLN/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-814997&DocumentId=814997_SDS_SI_SL.PDF&DocumentType=MSD&Language=SL&Country=SI&Origin=PDP&Display=inline

Može, R. (2007). Makroskopske in mikroskopske razlike med zavrtim poganjkom in sledjo iglic v lesu nekaterih iglavcev (Diplomsko delo). Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana.

Naturstoffe & Forschung (2020). Limonen. Pridobljeno s <https://de.naturalproducts.wiki/terpene/limonen>

Navadna smreka (*Picea abies*) (b. d.). Pridobljeno s: http://www2.arnes.si/~opoljanelj/projekti/gozdna_pot/izkaznica_dreves_smreka.htm

Nemeček, N. (2011). Zahtevnejše instrumentalne analize metode. *Priročnik: Muzejska konzervatorska in restavratska dejavnost*. Skupnost muzejev Slovenije, Ljubljana. Pridobljeno s: <http://www.sms-muzeji.si/udatoteke/publikacija/netpdf/6-3-7.pdf>

Plajhner, M. (2018). Navadna smreka. *Viva*. Pridobljeno s: <https://www.viva.si/Alternativna-in-naravna-pomo%C4%8D/15334/Navadna-smreka>

Pohleven, J. (2018). Blagodejni učinki hlapnih organskih spojin iz lesa. *Lesarski utrip*, 24, 163, 37.

Pohleven, J., Burnard, M. D., Kutnar, A. (2019). Volatile organic compounds emitted from untreated and thermally modified wood – a review. *Wood and fiber science*, 3, 51, 1-24.

Roth, C. (2019). Varnostni list v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006, D-(+)-limonen Rotichrom® GC. Pridobljeno s: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-5198-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyODcwMDB8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNWQvaDE2Lzg5NzE0MjI4MjY1MjYucGRmfDcwOTM2MDcxZWVmNzhjZjgxMDYyNjgwZGRkMmQ5MzBiNmFIMmU5MGFiNzBkYzA1MjFjYjM0YjgyYzQ4NzBmMDA>

Roth, C. (2016). Varnostni list v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006, (-)-borneol Rotichrom® GC. Pridobljeno s: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-8495-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyMDEwMjB8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNzcvvaDEwLzg5NzE0ODIwMDU1MzQucGRmfDQ2ZDIhODJmMjFiNDImMGU1ZGRhMjRkMTI1ZDRhYmUzMjIjMDdlNjU3YjA2ODdhZmM0ZTE0NjE4ODUxYzA1ZWU>

Saljić, M. (2020). Limonen. Pridobljeno s: <http://www.saljic.si/sestavine/limonene>

Skrøppa, T. (2003). Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce, *Picea abies*. Pridobljeno s: https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/migrated/uploads/tx_news/Norway_spruce_Picea_abies_856.pdf

Smallwood, I. M. (1996). *Handbook of Organic Solvent Properties*, 1. izdaja, Elsevier, Oxford.

Svetila LED. (2013). Svetloba. Pridobljeno s: <https://svetilaled.wordpress.com/2013/04/12/svetloba/>

Tomšič, B., Simončič, B., Vince, J., Orel, B., Vilčnik, A., Fir, M., Šurca Vuk, A., Jovanovski, V. (2007). Uporaba ATR IR spektroskopije pri proučevanju strukturnih sprememb celuloznih vlaken. *Tekstilec*, 50, (1-3), 3-15.

Varstvo gozdov (b. d.). Usposabljanja za varno delo v gozdu varstvo pred podlubniki. Pridobljeno s: <https://www.program-podezelja.si/sl/knjiznica/249-usposabljanja-za-varno-delo-v-gozdu-varstvo-pred-podlubniki/file>

Vavdi, T. (2016). Ekstrakcija limonena iz storžev in smole smreke, analiza produktov ter opredelitev vpliva lubadarja na vsebnost limonena (Raziskovalno delo). Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo, Celje.

Visočnik, M. (2010). Vpliv salicilne kisline na vsebnost skupnih fenolov v lubju navadne smreke (*Picea abies* (L.) H. Karst) pri napadu osmerozobega smrekovega lubadarja (*Ips typographus* L.) (Diplomsko delo). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor.

Zavod za gozdove Slovenije (b. d.). Varstvo gozdov pred gozdnemu drevju škodljivimi organizmi. Pridobljeno s: http://www.zgs.si/delovna_podrocja/varstvo_gozdov/varstvo_gozdov_pred_gozdnemu_drevju_skodljivimi_organizmi/index.html

Zavod za gozdove Slovenije (b. d.). Varstvo gozdov pred podlubniki. Pridobljeno s: http://www.zgs.si/delovna_podrocja/varstvo_gozdov/varstvo_gozdov_pred_podlubniki/index.html

Zhao, T., Krokene, P., Björklund, N., Långström, B., Solheim, H., Christiansen, E., Borg-Karlson, A.-K. (2010). The influence of *Ceratocystis polonica* inoculation and methyl jasmonate application on terpene chemistry of Norway spruce, *Picea abies*. *Phytochemistry*, 71, 1332–1341.

Zule, J., Tišler, V., Žurej, A., Torelli, N. (2003). Isolation and characterization of essential oils from the cones of Norway spruce (*Picea abies* Karst.), European larch (*Larix decidua* Mill.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Zbornik gozdarstva in lesarstva; Forest and wood science & technology*. 71, 159–172. Pridobljeno s <http://eprints.gozdis.si/id/eprint/298>

7. DODATEK












Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H – stavki	P – stavki	CAS
Petroleter	/		   	H411- H335- H315- H304- H225	P240-P210- P403+P235- P301+P310-P273	64742-49-0
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07		H225	P210	64-17-5
Triklorometan	CHCl ₃	120,38	 	H302+ H373- H315- H351	P302+P352-P314	864-49-6
D-(+)-Limonen	C ₁₀ H ₁₆	136,2	  	H226- H315- H317- H410	P210-P273-P280- P302+P352	5989-27-5
(-)-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154,3		H228	P370+P378	464-45-9

Tabela 3: Varnostna opozorila kemikalij