

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**NEPOLĀRU ŠĶĪDINĀTĀJU IZMANTOŠANA
PRIEDES MIZAI LIPOFĪLU EKSTRAKTU
IEGŪŠANAI**

BAKALaura DARBS

Autore: **Alise Girdjuka**

Studenta apliecības Nr. ag16089,

Darba vadītāji: Dr.chem., prof. Arturs Vīksna,

Dr.chem. Māris Lauberts.

RĪGA
2019

KOPSAVILKUMS

Nepolāru šķīdinātāju izmantošana priedes mizai lipofilu ekstraktu iegūšanai.
Girdjuka A., zinātniskie vadītāji: Dr.chem, prof. Vīksna A., Dr.chem Lauberts M. Bakalaura darbs, 54 lappuses, 19 attēli, 8 tabulas, 79 literatūras avoti. Latviešu valodā.

PRIEDE, MIZA, EKSTRAKCIJA, LIPOFĪLI EKSTRAKTI, PAĀTRINĀTA ŠĶĪDINĀTĀJA EKSTRAKCIJA, MACERĀCIJA, FREONI, GH-MS.

Darbā ir apkopota informācija par augu biomasu – mizu, to sastāvu, nozīmi un ekstrakcijas metodēm. Darba ietvaros tika iegūti lipofīli ekstrakti no Latvijā augošās priedes mizas (*Pinus sylvestris L.*), izmantojot dažādas ekstrakcijas metodes ar n-heksānu – paātrināta šķīdinātāja ekstrakciju un macerāciju, kā arī ar sašķidrinātu freonu R134a. Iegūtie ekstrakti tika analizēti ar gāzes hromatogrāfu - masspektrometru. Lai aizstātu plaši lietotos videi nedraudzīgus šķīdinātājus kā alternatīva tika izvērtēta freonu lietošana.

ABSTRACT

Use of non-polar solvents for pine bark to obtain lipophilic extracts. Girdjuka A., scientific supervisors Dr.chem., prof. Vīksna A. and Dr. chem. Lauberts M. Bachelor thesis, 54 pages, 19 figures, 8 tables, 79 literature references. In Latvian.

PINE, BARK, EXTRACTION, LIPOPHILIC EXTRACTS, ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION, MACERATION, FREONS, GH-MS.

The work contains information on the plant biomass - bark, its composition, meaning and extraction methods. Lipophilic extracts from pine bark (*Pinus sylvestris* L.) growing in Latvia were obtained using different extraction methods, with n-hexane – accelerated solvent extraction and maceration, and also with liquefied freon R134a. The obtained extracts were analysed by gas chromatography - mass spectrometry. To replace the widely used environmentally unfriendly solvents as an alternative, freon use was assessed.

SATURS

KOPSAVILKUMS	2
ABSTRACT	3
SAĪSINĀJUMI	5
IEVADS.....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Latvijā augošu priežu raksturojums.....	7
1.2. Biomasa	8
1.3. Lignocelulozes biomasas sastāvs.....	11
1.3.1 Lipofilās ekstraktvielas.....	14
1.3.2 Polifenolu dabas ekstraktvielas	17
1.4. Augu biomasas paraugu sagatavošana	19
1.5. Augu biomasas ekstrakcija	20
1.6. Lipofilu ekstraktvielu analīze	31
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	32
2.1. Pētāmais paraugs	32
2.2. Darbā izmantotie trauki, aparatūra un reaģenti	32
2.3. Parauga priekšapstrāde	33
2.4. Mitruma un pelnu noteikšana	33
2.5. Priedes mizas ekstrakcija.....	34
2.6. Ekstraktu analīze.....	37
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	38
3.1. Mitruma un pelnu noteikšana	38
3.2. Ekstrakcijas produktu iznākumi	39
3.3. Parauga analīze	44
SECINĀJUMI	47
PATEICĪBAS	48
LITERATŪRAS SARAKSTS	49

SAĪSINĀJUMI

ASE – paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (accelerated solvent extraction)

FBE – virstošā slāņa ekstrakcija (fluidized - bed extraction)

GWP – globālās sasilšanas potenciāls (global warming potential)

HPLC – augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija (high – performance liquid chromatography)

HP-TLC – augsti efektīvā plānslāņa hromatogrāfija (high performance thin-layer chromatography)

ME – ekstrakcija mikroviļņu tehnikā (microwave – assisted extraction)

ODP – ozona slāņa noārdīšanas potenciāls (ozone depletion potential)

PMAE – ekstrakcija mikroviļņu tehnikā spiediena apstākļos (pressurized microwave extraction)

SFMAE – ekstrakcija mikroviļņu tehnikā bez šķīdinātāja (solvent - free microwave – assisted extraction)

T_k – kritiskā temperatūra

UE – ultraskaņas ekstrakcija

UV – ultravioletais starojums

W_r – relatīvais mitruma saturs, %

VMD – Valsts Meža dienests

IEVADS

Priede (*Pinus sylvestris*) ir visizplatītākā koku suga Latvijā. Tās koksne vēl joprojām ir viens no plašāk izmantotajiem materiāliem gan mēbeļu ražošanā, gan būvniecībā, gan arī dažādu citu lietu izgatavošanā. Neviena mākslīgi radītais materiāls nav spējis konkurēt ar priedes koksni tieši tās labo īpašību dēļ. Miza, kura paliek pāri lielos apjomos Latvijā (apmēram 1 mlj. m³) pēc koksnes apstrādes procesiem netiek pilnvērtīgi izmantota, tāpēc nepieciešams rast veidus kā to efektīvi pārstrādāt. Viena no iespējām, kā koksnes mizu pēc iespējas lietderīgāk izmantot, ir vērtīgu savienojumu iegūšana no tās. Viens no perspektīviem ceļiem, lai palielinātu mizas potenciālo vērtību, ir no tās iegūt bioloģiski aktīvus savienojumus. Vieni no šiem savienojumiem ir mizā esošie lipofīlie savienojumi, kur kā galvenie komponenti ir dažādi terpēni, vaski un citi savienojumi, kuriem piemīt antibakteriālas īpašības, tādējādi paverot plašas lietošanas iespējas kosmētikas līdzekļu, farmaceitisko līdzekļu ražošanai, kā arī to pielietošana medicīnā. Pazīstamākie savienojumi, kas ir atrodami arī Latvijā augošo skujkoku mizās, ir terpēni, it sevišķi alfa-pinēni, kurus lieto kā labus krāsu un laku šķīdinātājus, kā arī par organiskās sintēzes izejvielu. Tos terpēnus, kuriem ir patīkama smarža, lieto parfimērijā. Parasti lipofīlās ekstraktvielas iegūst ar tādiem organiskajiem reaģentiem, kā heksāns un citiem videi nedraudzīgiem, toksiskiem šķīdinātājiem, tāpēc ir nepieciešams meklēt alternatīvus risinājumus. Kā viena no alternatīvām, kas ir tikai attīstības stadijā, ir izmantot sašķīdinātās gāzes (darbā tiks izmantots freons R134a), kas iepriekš nav izmantotas Latvijā augošu priedes mizu ekstrakcijai, bioloģiski aktīvu vielu iegūšanai. Literatūrā trūkst informācijas par sašķīdināto gāzu ekstrakciju un ekstraktu sastāvu no dažādām izejvielām.

Bakalaura darba mērķis ir izvērtēt alternatīvo šķīdinātāju izmantošanu lipofīlo savienojumu iegūšanai no Latvijā augošās priedes mizas.

Saskaņā ar darba mērķi ir izvirzīti sekojoši **darba uzdevumi**:

1. Veikt literatūras izpēti par mizas lipofīlo ekstraktvielu sastāvu un to iegūšanas metodēm.
2. Iegūt lipofīlās ekstraktvielas no Latvijā augošu priežu mizas, izmantojot klasiskās un alternatīvas ekstrakcijas metodes.
3. Novērtēt iegūto lipofīlo ekstraktu iznākumus un to sastāvu, izmantojot GH-MS analīzi.
4. Novērtēt alternatīvu šķīdinātāju – freona R134a izmantošanas iespējas lipofīlo ekstraktvielu iegūšanai no priedes mizas.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Latvijā augošu priežu raksturojums

Pēc Valsts Meža dienesta rīcībā esošiem datiem, meži Latvijā aizņem 3,02 milj. ha, kas sastāda 52 % no kopējās valsts teritorijas platības. 2010. gadā Latvija bija ceturta mežiem bagātākā valsts starp visām Eiropas Savienības dalībvalstīm [1].

Pēdējo gadu laikā tiek veikta lauksaimniecībā neizmantoto teritoriju apmežošana maksimālā veidā, kā arī notiek to dabiska aizaugšana. Tā, nepilnu 96 gadu laikā, mežainuma kopējā platība Latvijas teritorijā ir pieaugusi no 23 % līdz 52 % (salīdzinot ar 1923. gada VMD datiem). Valdošās koku sugas Latvijas mežos ir skuju koki – priede un egle, tās sastāda ap 52 % no visu mežu platības. Tām seko bērzu (30 %), baltalkšņu (7 %), un apšu audzes (7 %).

Priedes (*Pinus*) pieder pie priežu dzimtas (*Pinaceae*) ģints. Tie ir vienmājas mūžzaļi skuju koki (retāk – krūmāji), bagāti ar sveķiem. Kopā ir zināmas ap 130 priežu sugām, taču Latvijas teritorijā savvaļā ir sastopama tikai viena suga – parastā priede (*Pinus sylvestris* L.), kura ir visizplatītākā koku suga Latvijas mežos (ap 40 % no visas mežu kopplatības) Pārējās sugas Latvijā ir introducētas [2].

Parastai priedei (*Pinus sylvestris* L.) ir vairākas pasugas:

- Rīgas priede (*Pinus sylvestris* var. *rigensis* (Desf.) Asch. et Graebn.) – taisna stumbra, strauji augošs koks. Aug Baltijas jūras piekrastē, dienvidaustrumu daļā.
- Kaukāza priede (*Pinus sylvestris* var. *hamata* Stew.) – siltumu un gaismu mīlošs koks ar stipri sazarotu vainagu un rauktu stumbru. Savvaļā aug Kaukāzā un Krimā.
- Lapzemes priede (*Pinus sylvestris* var. *lapponica* Fries ex Hartman) – lēni augošs koks ar šauru, eglei līdzīgu vainagu un blīvām skujām. Aug Eiropas ziemeļos.

Parastā priede var izaugt līdz pat 40 metriem, un tās mūža ilgums var sasniegt 300 – 350 gadus. Parastā priede spēj augt gan smiltīs, gan slapjās un purvainās augsnēs, taču neaug apēnotajās vietās. Aptuveni pēc 10 – 15 gadiem priedei stumbra lejasdaļā parādās kreves miza tumši brūnā krāsā, savukārt augšdaļā – plēkšņaina miza sarkanbrūnā krāsā. Priedei augot, katru gadu veidojas zaru mieturis, līdz ar to ir iespējams noteikt priedes vecumu. Ziedēšanas laiks ir maija beigās – jūnija sākums.

Latvijā ir sastopamas arī citas priežu sugas: Kalnu priede (*Pinus mugo* Turra, agrāk *Pinus montana* Mill.), Melnā priede (*Pinus nigra* Arnold), Eiropas ciedrupriede (*Pinus cembra* L.), Sibīrijas ciedrupriede (*Pinus sibirica* Du Tour), Korejas ciedrupriede (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.), Klājeniskā ciedrupriede (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) un citas.

Priedes koksnei ir liela saimnieciskā nozīme Latvijā un visā pasaulē – tas ir vērtīgs izejmateriāls būvniecībā, galdniecībā, papīra, kokogļu un spirta ražošanā, kā arī citās ražošanas nozarēs. Ēku būvniecībā vispopulārākā ir tieši priedes koksne, pateicoties tās mehāniskām īpašībām un izturīgumam pret nodilumiem, plaisāšanu, trūdēšanu, temperatūras un mitruma svārstībām. Tā ir taisnšķiedraina, viegli skaldāma un apstrādājama ar griezējinstrumentiem. Lietderīgi tiek pārstrādāta tikai puse no koku biomasas kopējā apjoma. Mūsdienās arvien populārāka paliek tāda priekšapstrādes metode kā mizošana, līdz ar to mizas krājumi rūpnīcās pieaug katru dienu. Mizu, kura paliek pāri lielos daudzumos (11 % no koksnes apjoma) eksportē, daļu izmanto komposta, biogāzes un tanīnu ieguvei, mulčas un siltumizolācijas materiālu ražošanā, celtniecībā, un tikai neliela daļa tiek ķīmiski pārstrādāta, iegūstot bioloģiski aktīvi savienojumus.

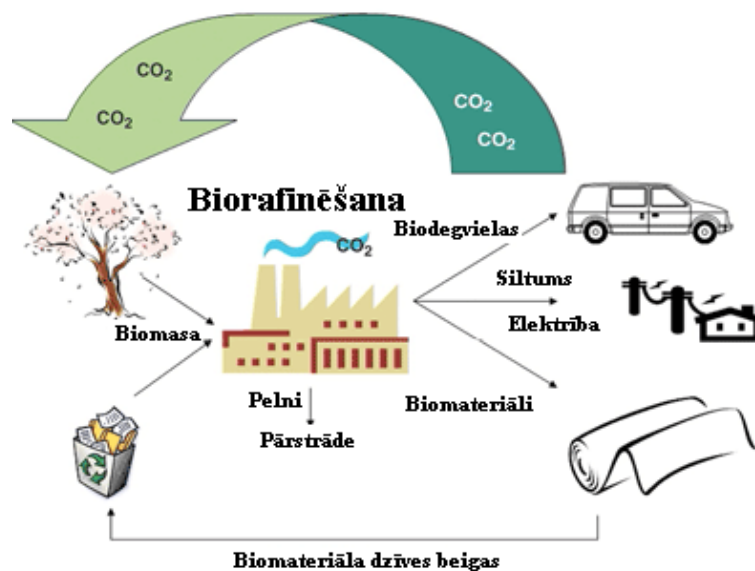
Pārstrādājot priedes mizu tiek iegūti vērtīgi produkti, kurus var tālāk izmantot farmācijā un kosmetoloģijā kā antioksidantus, antibakteriālos, pretsāpju un pretiekaisuma līdzekļus, līdzekļus holesterīna līmeni pazemināšanai, osteoartrozes, centrālās nervu sistēmas, sirds un asinsvadu sistēmas, nieru un plaušu ārstēšanai, kā arī citiem nolūkiem [3].

1.2. Biomasa

Biomasa ir dabiska organiska viela, kas ir pieejama un atjaunojama, tajā ietilpst tādi biomasas avoti, kā, graudaugi un koksne, lauksaimniecības un lopbarības kultūraugi, koksnes atkritumi u.c. jebkurš bioloģisks materiāls, kas var tikt lietots kā enerģijas avots. Tai ir liela perspektīva nākotnē un nozīme enerģētikas infrastruktūrā – no tās iegūst elektroenerģiju un siltumu, kā arī tiek iegūti biopolimēri un bioķīmikālijas [4]. Biomasi izmanto kā izejvielu kompozītmateriālu ražošanai (papīrs, kokskaidu plātnes, biokompozīti, bioplastmasa un citi). Dažādu veidu augu biomasa, piemēram, kokaugi, zālaugi, stiebrzāles, ūdens augi, lauksaimniecības kultūraugi un to atliekas, cietie sadzīves atkritumi un mēslojums satur dažādu daudzumu celulozi, hemicelulozes, lignīna un ekstraktvielas [5].

Biomasa, atšķirībā no naftas, ir atjaunojams resurss. Lai naftas produktus varētu izmantot pilnvērtīgi, ir jāveic to apstrāde jeb rafinēšana. Tā kā naftas produkti nav atjaunojami un to attīrīšanai ir jāizmanto kaitīgi šķīdinātāji tie rada globālās sasilšanas problēmas visā pasaulē, ir jāvirzās uz to, lai aizstātu naftas produktus ar alternatīvu izejvielu un enerģijas ražošanai - biomasu. Biomasas efektīva pārstrāde dod iespēju iegūt veselu virkni izejvielu, kuras tiek izmantotas dažādu produktu ar augstu pievienotu vērtību ražošanā un ceļš kā to panākt ir izmantot biorafinēšanas pieeju [6]. Progresīva pieeja ilgtspējīgai attīstībai ir bāzēties uz biobāzētu produktu efektīvu izmantošanu (1.1. att.), kas ir biorafinēšanas pamatdoma [7].

Biorafinēšanu var konceptuāli uzskatīt par līdzvērtīgu, kā naftas/naftas pārstrāde, izņemot to, ka šajā gadījumā tā izmanto augu materiālus (atjaunojamus resursus, kas iegūti no augiem, kuri veic fotosintēzi), bet naftas pārstrādē izmanto neatjaunojamus fosilos dabas resursus, kas iegūti no naftas, akmeņogles, dabasgāze [8].



1.1. att. Biomases biorafinēšanas cikla shematisks attēlojums [9]

Augu biomasu galvenokārt iedala četros veidos [10, 11]:

- Kokaugos;
- Zālaugos/graudzālēs;
- Ūdensaugos;
- Augu biomasas pārstrādes blakusprodukti.

Lignocelulozes saturoši materiāli, piemēram zemas vērtības mežsaimniecības un lauksaimniecības atlikumi, ir daudzsoļīga izejviela pievienotās vērtības produktu ieguvei. Kaut gan daži produkti, galvenokārt, biodegviela, tiek iegūta no lignocelulozes saturošām izejvielām, tomēr pastāv vairākas iespējas izmantot tās potenciālu pilnīgāk, iegūstot plašāku spektru ar produktiem. Šāda atkritumu vielu pārstrāde dod iespēju uzlabot dažādu tautsaimniecības nozaru kompetenci, kā piemēram, ievest šo pieeju tradicionālajās celulozes un papīra ražotnēs [12].

Lignocelulozes biomasas. Lignocelulozes izejvielas avots ir mežs, lauksaimniecības atkritumi, rūpniecības blakusprodukti un atkritumi (tādi kā koksnes un meža rūpniecības atkritumi).

Lignoceluloze sastāv no trim galvenajiem komponentiem: celulozes, hemicelulozēm un lignīna. Koksnes lignocelulozes materiālu sastāvs parasti ir 45 – 56 % celulozes, 10 – 20 % hemicelulozes un 18 – 30 % lignīna. Lauksaimniecības atlikumi (kviešu salmi, kukurūzas

vālītes u.c.) sastāv no 30 – 45 % celulozes, 16 – 29 % hemicelulozes un 3 – 13 % lignīna. Tas ir polimēru hetero-maisījums, kura relatīvais sastāvs ir atkarīgs no auga tipa, sugas, biomasas avota.

Lignīns, celuloze un hemicelulozes šūnas apvalkā ir saistītas lignīn-ogļūdeņražu kompleksā. Kompleksa veidošanās notiek pateicoties ne tikai Van-der-Vālsa spēkiem un ūdeņraža saitēm, bet arī ķīmiskajām saitēm, tādēļ lignīnu ir grūti izdalīt no koksnes [13]. Atkarībā no lignocelulozes biomasas veida tas ir polimērs kas ir kompleksā veidā saistīts trīsdimensionālā struktūrā ar atšķirīgu pamatkomponentu daudzumu [14].

Sastāvs ir atšķirīgs ne tikai dažādu sugu augiem, bet arī vienādas sugas augiem, atkarībā no tā vecuma, augšanas stadijas, un analizējamās augu daļas [15]. Kā redzams 1.1. tabulā, visvairāk celulozes ir lapkoksnes biomasas sastāvā. Latvijā plaši sastopamās apses biomasas sastāvā ir 50,8 - 53,3 % celulozes. Hemicelulozes saturs ir ļoti atšķirīgs katram biomasas veidam, savukārt lignīnu visvairāk satur skujkoksnes biomasā, piemēram, egles biomasā ir 27,9 % lignīna.

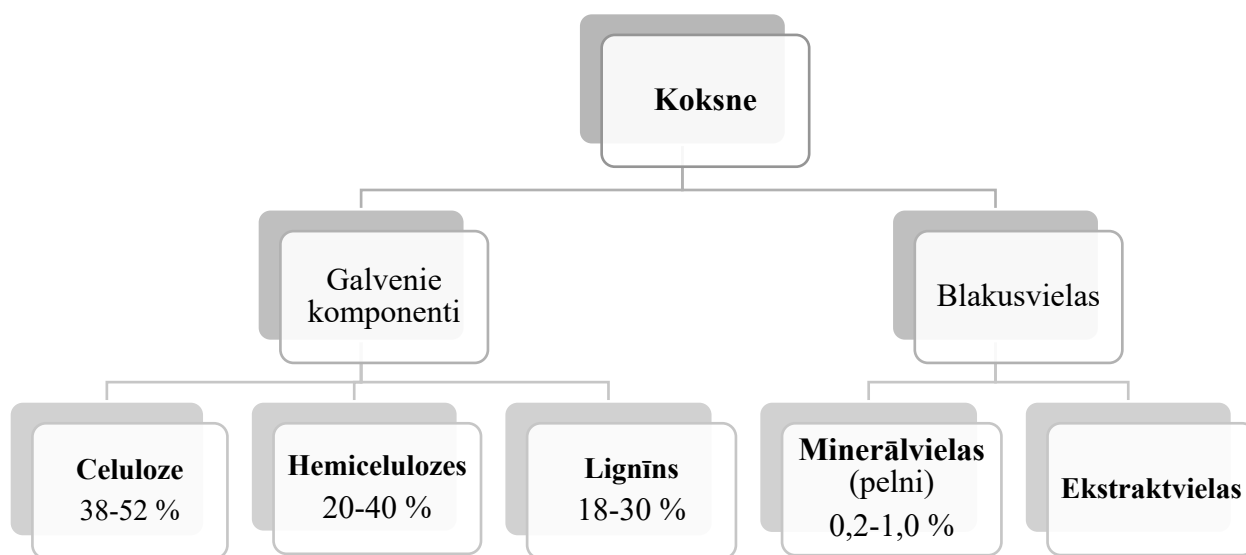
1.1. tabula

Lignocelulozes biomasu veidi un to ķīmiskais pamatkomponentu sastāvs [16]

Lignocelulozes biomasā		Celuloze, %	Hemiceluloze, %	Lignīns, %
Lapkoksne	Apse	50,8 - 53,3	26,2 - 28,7	15,5 - 16,3
	Ozols	40,4	35,9	24,1
	Eikalipts	54,1	18,4	21,5
Skujkoksne	Priede	42,0 - 50,0	24,0 - 27,0	20,0
	Duglasa egle	44,0	11,0	27,0
	Egle	45,5	22,9	27,9
Lauksaimniecības atkritumi	Kviešu salmi	35,0 - 39,0	23,0 - 30,0	12,0 - 16,0
	Miežu ārējais slānis	34,0	36,0	13,8 - 19,0
	Miežu salmi	36,0 - 43,0	24,0 - 33,0	6,3 - 9,8
	Rīsu stiebri	29,2 - 34,7	23,0 - 25,9	17,0 - 19,0
	Rīsu sēnālas	28,7 - 35,6	12,0 - 29,3	15,4 - 20,0
	Auzu salmi	31,0 - 35,0	20,0 - 26,0	10,0 - 15,0
	Kukurūzas vālītes	33,7 - 41,2	31,9 - 36,0	6,1 - 15,9
	Kukurūzas stiebri	35,0 - 39,6	16,8 - 35,0	7,0 - 18,4
	Cukurniedru šķiedrains atlikums	25,0 - 45,0	28,0 - 32,0	15,0 - 25,0
Sorgo salmi	32,0 - 35,0	24,0 - 27,0	15,0 - 21,0	
Stiebrzāles	Stiebrzāles	25,0 - 40,0	25,0 - 50,0	10,0 - 30,0

Lielāko daļu no lignocelulozes biomasas veido koki – koksne, miza, lapas, sakņu sistēma un zari [16].

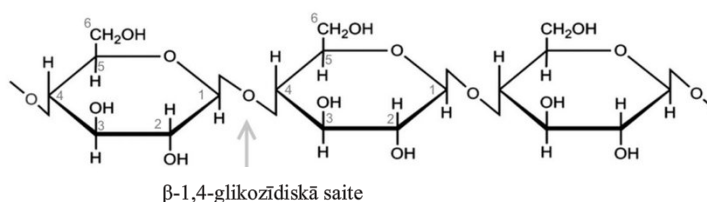
Koksnes komponentsastāvs ir atspoguļots 1.2. attēlā. Tās elementsastāvā ir aptuveni 50 % oglekļa, 43 % skābekļa, 6 % ūdeņraža, nedaudz slāpekļa, un pelni ar dažādu metālu joniem sastāvā [17].



1.2 att. Koksnes ķīmiskais komponentsastāvs [13]

1.3. Lignocelulozes biomasas sastāvs

Celuloze. Celuloze ir koksnes struktūras galvenais komponents, izplatītākais dabas sintezētais polimērs. Tas ir lineārs polimērs, polisaharīdu klases savienojums ar empīrisku formulu $[C_6H_{10}O_5]_n$. Celulozes struktūrformula ir atspoguļota 1.3. attēlā. Tā kā celulozi veido -D-glikopiranozes, kas saistītas ar glikozīdiskām saitēm (1 - 4), to var definēt arī kā ogļhidrātu. Augu celulozes polimerizācijas pakāpe ir 7000 - 15000, ar molekulāro masu lielāku par 1500 kDa. To ir grūti izolēt no koksnes tūrā veidā, jo celuloze cieši saistās ar lignīnu un hemicelulozi [18].



1.3. att. Celulozes struktūrformula [18]

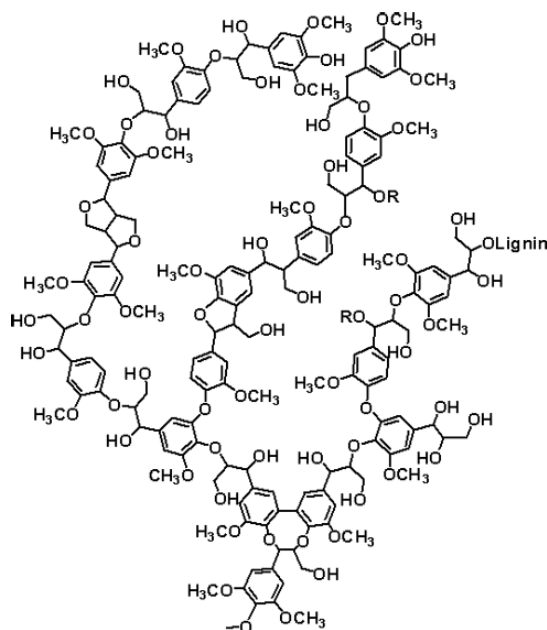
Celulozes molekulām ir liela tendence veidot iekšmolekulārās ūdeņraža saites. Šādi celulozes molekulas apvienojas mikrofibrillās, kuras var būt sakārtotas dažādos līmeņos: cieši un paralēli novietotas mikrofibrillas posmi (kristālsikais rajons), un haotiski novietotas mikrofibrillas posmi (amorfais rajons). Mikrofibrillas veido fibrillas, un galu galā celulozes šķiedras. Kristāliskajos rajonos šķīdinātājam un reaģentiem ir grūtāka piekļūšana, nekā amorfajos rajonos, mikrofibrillas novietošanas dēļ [19]. Celuloze nešķīst ūdenī un organiskajos šķīdinātājos, taču noteiktos apstākļos šķīst neorganiskajos šķīdinātājos. Sārnu šķīdumi izsauc celulozes uzbriešanu (kā rezultātā rodas alkaliceluloze un saistās ūdens), bet atkarībā no celulozes destrukcijas pakāpes un sārma koncentrācijas, var tikt panākta arī šķīšana.

Celulozi izmanto papīra un kartona ražošanā, celulozes esteru, viskozes šķiedru, celofāna ražošanā, tekstilražošanā un medicīnā. Celulozes un to esteru ražošanai ir lielas perspektīvas - no tiem var iegūt visdažādākos materiālus, kuriem piemīt īpaši vērtīgas un specifiskās īpašības. Svarīgi, ka ar pareizu mežu apsaimniekošanu, izejvielu avots ir praktiski neierobežots un var būt pilnīgi atjaunojams.

Hemicelulozes. Par hemicelulozēm (jeb poliozēm) sauc polisaharīdus, kuri ir sintezēti koksne galvenokārt no glikozes, mannozes, galaktozes, ksilozes, arabinozes, 4-O-metilglikourānskābes un galakturonskābes atlikumiem. Atšķirībā no celulozes, hemicelulozēm ir daudz mazāka molekulāra masa, molekulu ķēdes ir īsākas un to struktūra mēdz būt sazarota. Hemicelulozes labi šķīst sārnu šķīdumos un viegli hidrolizējas ar skābēm.

Lignīns. Lignīns ir otrs izplatītākais dabas sintezēts polimērs. Pilnīgi korekta makromolekulas struktūrformula lignīnam joprojām nav zināma. Tas ir amorfs polimērs ar tīklveida režģa uzbūvi, kura struktūru veido fenilpropāna vienības, saistītas ar ēteriskām un C-C saitēm. Lignīna struktūrformula ir atspoguļota 1.4. attēlā.

Lignīnu vispārēji iedala: skujkoku, lapkoknes un zāles lignīnos. Dabiskais lignīns ir trīsdimensiju struktūras, organiskos šķīdinātājos un ūdenī nešķīstošs savienojums, taču izolēto lignīnu maksimālo šķīšanu var panākt, izmantojot tādus šķīdinātājus, kā: dioksāns, acetons, tetrahidrofurāns, 2-metoksietanols, dimetilformamīds un dimetilsulfoksīds [20]. Zinātnieks Freudenbergš tēlaini salīdzināja koksnes šūnu sienīgas ar dzelzsbetona konstrukciju, kurā celulozes fibrillām piemīt armatūras funkcija, savukārt lignīnam un hemicelulozēm - saistvielas (cementa) funkcija. Šo domu tālāk zinātniski pamatoja un attīstīja Pēteris Eriņš (KĶI), attēlojot koksnes šūnas sienīgas virsmolekulāro modeli kā kompozīta materiālu, kurā celulozes armatūra ir iebūvēta lignīnā - hemiceluložu matricā. Tādējādi koksni var raksturot kā triju komponentu savstarpēji cauraustu tīklveida struktūru, kuru saista ūdeņraža saites starp komponentu hidroksilgrupām [21].



1.4. att. Lignīna struktūrformula [22]

Lignīna izdalīšanas metodes no koksnes iedalās:

1. Holocelulozes (celuloze + hemiceluloze) šķīdināšana. Paliek pāri lignīns, kuru ir iespējams nofiltrēt.
2. Lignīna šķīdināšana, un no iegūtā šķīduma izdala to ar dažādiem paņēmieniem.

Minerālvielas. Minerālvielas jeb pelni ir cietas, neorganiskās atliekas, kas paliek pāri pēc parauga sadedzināšanas augstā temperatūrā. Parasti kokiem, kas aug mērenā klimatā pelnu saturs ir mazāks kā tropu klimatā augošiem. Pelnu saturs atšķiras atkarībā no koka daļas, jo atšķiras arī sāls daudzums šūnu membrānās. Tā, piemēram, atšķirās pelnu saturs arī priedei – stumbrā tas sastāda 0,2 – 0,7 %, koksnē 1,4 – 2,2 %, bet zaros un saknēs 0,3 – 0,7 %. Lielāko daļu pelnu veido dažādu metālu sāļi, kā, piemēram, karbonāti, silikāti, oksalāti un fosfāti. Biežāk sastopamie metāli ir kalcija, kālija, magnijs.

Koku pelni tiek izmantoti mežsaimniecībā un lauksaimniecībā par mēslojumu, jo tie satur augiem un mežam nepieciešamos mikroelementus. Mežkopībā pelnus izmanto, lai atjaunotu augsnes buferespēju. Lai uzskatītu pelnus par pilnvērtīgu mēslojumu, tiem bieži vien pievieno slāpekli [23].

Ekstraktvielas. Par ekstraktvielām sauc mazmolekulāros savienojumus jeb augu biomasas sekundāros metabolītus. Tās veido liels skaits atsevišķu savienojumu - gan gan hidrofilo. Ekstraktvielu saturs ir atkarīgs no koku sugas, gadalaika, koka augšanas vietas, klimatiskajiem apstākļiem un citiem faktoriem. Ekstraktvielas ir unikālas un neatkārtojamas tādā ziņā, ka katrai koku sugai ekstraktvielu sastāvs ir pilnīgi atšķirīgs. Ar nepolāriem

organiskiem šķīdinātājiem (heksānu, benzolu, metilēnchlorīdu) izdala lipofilās vielas: taukus, taukspirtus, sveķskābes, brīvās taukskābes, šo skābju ēterus, sveķus, fitosterīnus, vaskus u.t.t. Galvenās ekstraktvielu grupas ir: alifātiskie un alicikliskie savienojumi - terpēni un terpenoīdi (ieskaitot sveķskābes un steroīdus), taukskābju esteri, taukskābes un taukspirti, alkāni; polifenolu dabas savienojumi - stilbenoīdi, lignāni, kondensēti tanīni, flavonoīdi, hidrolizējamie tanīni; polisaharīdi un citi.

Ekstraktvielas sastāda 4 – 10 % no koksnes, koku sugām kas aug mērenā klimatā. To saturs un ķīmiskais sastāvs ir ļoti atšķirīgs no koka sugas un klimata, kurā tas aug. Tā, piemēram, koku sugām, kuras aug tropu klimatā, ekstraktvielu saturs var būt līdz 20 % no sausnas svara. Turklāt arī vienas koka sugas ekstraktvielu ķīmiskais sastāvs atšķiras, atkarībā no analizējamās koka daļas – saknes, miza, stumbra, zari, skuju, zaļie pumpuri, tā, piemēram, koku miza var saturēt līdz pat 40 % ekstraktvielu. Ekstraktvielām ir liela nozīme - tās ir nepieciešamas, lai saglabātu daudzveidīgas bioloģiskās funkcijas biomasā. Piemēram, tauki ir koksnes šūnu enerģijas avots, bet sveķskābes un fenoliskie savienojumi aizsargā koku no biotiskiem un abiotiskiem faktoriem, kā no mikrobioloģiskiem bojājumiem un kukaiņu uzbrukumiem, UV starojuma u.c. Ekstraktvielas ietekmē koka krāsu un smaržu. Pēc koka nozāģēšanas, ekstraktvielu saturs kokā strauji samazinās un izmainās frakcijas ķīmiskais sastāvs. Skābekļa klātbūtne ietekmē C=C dubultsaiti ekstraktvielās, kas izraisa ķēdes reakciju, kuru rada brīvie radikāļi. Brīvie radikāļi, savukārt, ir ļoti spēcīgi oksidētāji. Turklāt, daži enzīmi oksidē ekstraktvielas, kā arī darbojas kā katalizators esterificēto savienojumu hidrolīzes reakcijā. Šīs ķīmiskās un bioķīmiskās reakcijas lielā mērā ietekmē koksnes ķīmisko sastāvu, taču tās notiek krietni ātrāk, ja koksne tiek uzglabāta šķeldu veidā, nevis koka balķu veidā. Zināms ir arī fakts, ka glicerīdu hidrolīze līdz brīvām taukskābēm un glicerolam notiek ātrāk, ja koksni glabā mitrā vidē, nevis sausā [20].

1.3.1 Lipofilās ekstraktvielas

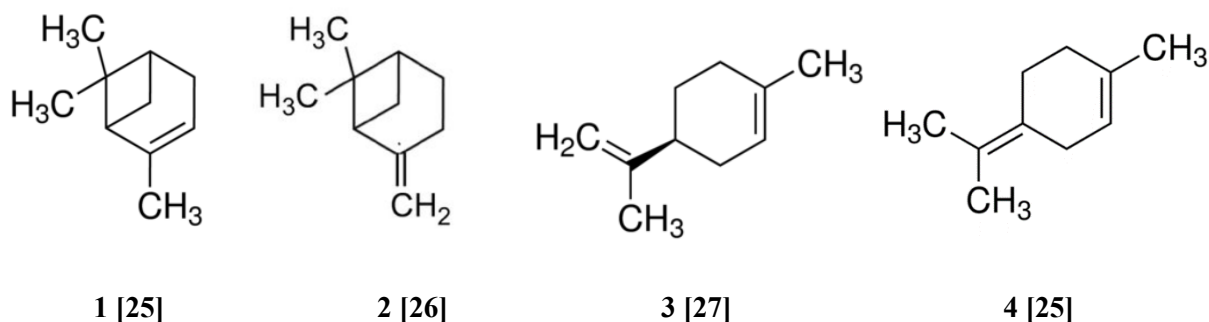
Terpēni un terpenoīdi. Ar terminu “terpēni” apzīmē gaistošus ogļūdeņražu savienojumus, kuru pamatstruktūru veido izoprēna vienības. Terpenoīdi - terpēnu atvasinājumi, satur ne tikai ogļūdeņraža skeletu, bet arī skābekli saturošu funkcionālu grupu (piemēram, spirti, aldehīdi, ketoni). Terpēni un to atvasinājumi veido ļoti lielu savienojumu klasi. Lielā daudzumā tie atrodas skuju koku sveķos un to pārstrādes produktā – terpentīnā. Vairāk nekā 4000 savienojumu tika izolēti un identificēti augu un dzīvnieku biomasās. Terpēni tiek plaši lietoti kā šķīdinātāji laku un līmes ražošanā, kā dezinfekcijas līdzeklis farmācijā, kā smaržvielas (ēterisko eļļu pamatsastāvdaļa) un garšvielas [24].

Tā kā terpēnu struktūras pamatā ir izoprēns, tos var klasificēt pēc saistīto izoprēna vienību skaita:

- Monoterpēni ($C_{10}H_{16}$)
- Seskviterpēni ($C_{15}H_{24}$)
- Diterpēni ($C_{20}H_{32}$)
- Triterpēni ($C_{30}H_{48}$)
- Politerpēni ($>C_{40}H_{64}$)

Zemākie terpēni (monoterpēni un seskviterpēni) ir gaistoši, smaržīgi un ūdenī vāji šķīstoši savienojumi. Augstākie terpēni (diterpēni, triterpēni, politerpēni) ir viskozas vielas vai kristāliskas vielas, kuras spēj viegli izomerizēties un oksidēties gaisa skābekļa klātbūtnē.

Monoterpēni. Monocikliskus terpēnus sauc arī par izoprenoīdiem. Monoterpēni sastāv no divām izoprēna molekulām. Savienojumi no šīs grupas ir dominējoši terpenoīdu gaistošā frakcijā. Tos atdala no dažādām koka daļām ar tvaika destilāciju. Liela nozīme ir monoterpēnam α -pinēnam (**1**), kas ir priežu terpentīna galvenā sastāvdaļa, β -pinēnam (**2**), limonēnam (**3**) un terpinolēnam (**4**). Šo savienojumu struktūrformulas ir attēlotas 1.5. attēlā.

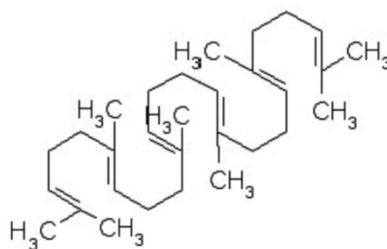


1.5.att. Nozīmīgāko monoterpēnu struktūrformulas

Seskviterpēni. Šie savienojumi sastāv no trim izoprēna molekulām. Pie seskviterpēniem pieskaita arī piesātinātākus savienojumus ar molekulformulu līdz $C_{15}H_{32}$, kā arī skābekli saturošus savienojumus. Tika identificēti vairāk kā 2500 tādu savienojumu, taču tie ir sastopami ļoti mazos daudzumos un rūpniecībā tie ir mazsvarīgi.

Diterpēni. Šie savienojumi sastāv no divām izoprēna molekulām. Gandrīz visi plašāk izplatītie un nozīmīgākie bicikliskie terpēni ir mentāna atvasinājumi. Nozīmīgākais savienojums ir kamfora - tam piemīt izteikta smarža, tas tiek plaši lietots aromaterapijā, rūpniecībā - bezdūmu šaujampulvera ražošanā, kā piedeva celulozes atvasinājumiem, kosmetoloģijā un medicīnā kā antiseptiķi, analeptiķi un pretiekaisuma līdzekļi. Savienojumam ir paaugstināta bioloģiskā aktivitāte.

Triterpēni. Tricikliskie terpēni ir plaši sastopami augos. Tie ir ļoti līdzīgi steroīdiem, gan pēc struktūras, gan biogēnētiski. Tiem ir lipofils ogļūdeņraža skelets, līdz ar to savienojumi ir hidrofobi, neskatoties uz hidroksilgrupas klātbūtni. Viens no nozīmīgākajiem triterpēniem ir skvalēns (struktūrformula dota 1.6. attēlā). Tas ir atrodams visos augstākajos organismos un daudzu augu biomasās; īpaši lielos daudzumos skvalēns atrodas haizivju aknās. Skvalēns tiek lietots kosmētikas ražošanā lielākoties kā ādas mitrinātājs un grumbu izlīdzināšanas līdzeklis.



1.6. att. Skvalēna struktūrformula [28]

Politerpēni. Policikliskie terpēni pārsvarā ir sastopami augstākajos augos, īpaši lapās, bet nav koksnes sastāvā. Izņēmums ir betulaprenols - šis savienojums ir atrasts taukskābju estera veidā bērza koksne (*Betulla verrucosa*) [29].

Taukskābes, taukspirti un vaski. Šos savienojumus sauc arī par vienkāršiem lipīdiem. Taukskābju struktūra sastāv no garas piesātinātas vai nepiesātinātas alifātiskās oglekļa virknes, parasti C₈-C₁₈, taču eksistē taukskābes arī ar garāku virkni līdz pat C₃₆. Dabā taukskābes visbiežāk ir sastopamas nesazarotā veidā ar pāra skaita C atomu [30]. Taukskābes ar nepāra oglekļa atomu skaitu atrodamas baktērijās un zemākos augos, piemēram, aļģēs, ķērpjos u.c. [31].

Pēc nepolārās ogļūdeņražu alkānu ķēdes garuma taukskābes iedala [32]:

- īsas virknes (C₂ - C₆) taukskābes
- vidējas virknes (C₆ - C₁₀) taukskābes
- garas virknes (≥ C₁₂) taukskābes

Augu biomasā biežāk var atrast gan piesātinātas, gan nepiesātinātas taukskābes. Piesātinātās: laurilskābe, palmitīnskābe, stearīnskābe u.c.; nepiesātinātās: oleīnskābe, linolskābe, arahidonskābe un citas.

Par taukspirtiem sauc spirtus ar garu alifātisku virkni (C₈ - C₂₂), ar 1 - 3 hidroksilgrupām. Spirtus, kuriem ir vairāk par trim hidroksilgrupām, uzskata par radniecīgiem ogļhidrātiem, kuri labi šķīst ūdenī, līdz ar to tie nepieder pie lipīdiem. Iedala piesātinātus un nepiesātinātus taukspirtus. Visbiežāk taukspirti ir sastopami augos - vasku sastāvā. Taukspirti tiek izmantoti ziepju, plastifikatoru un šķīdinātāju ražošanā.

Par vaskiem sauc augstāko taukskābju un augstāko vienatomu vai divatomu spirtu esterus. Vaski, pēc to struktūras un īpašībām ir līdzīgi glicerīdiem. Vaskiem ir liela nozīme augu aizsargfunkcijā - tie pārklāj augu lapas un augļus, tādā veidā aizsargājot tos no liela ūdens daudzuma zaudēšanas. Šos savienojumus plaši izmanto kosmētikas ražošanā, piemēram, lūpu balzāmu un visāda veida krēmu ražošanā, kā arī vaski tiek lietoti grīdu un automašīnu vaskošanai [33].

Taukskābju esteri. Taukskābju (augstāku karbonskābju) un glicerīna esterus, vaskus un sterilesterus sauc par neitrāliem lipīdiem. Pēc esterificēto glicerīna hidroksilgrupu skaita taukskābes iedala [34]:

- monoglicerīdos
- diglicerīdos
- triglicerīdos

Neitrālos taukus iedala arī pēc taukskābes veida: vienkāršos un jauktos. Vienkāršie glicerīdi sastāv no vienādām taukskābēm, savukārt jauktos glicerīna hidroksilgrupas ir esterificējušās ar dažādām taukskābēm [35].

Taukskābju mono- un diglicerīdi tiek plaši lietoti pārtikas rūpniecībā kā pārtikas piedeva E471 – emulgators, stabilizētājs. E471 izmanto majonēzes, margarīna, konditorejas krēma, glazūras un citu produktu ražošanā.

1.3.2 Polifenolu dabas ekstraktvielas

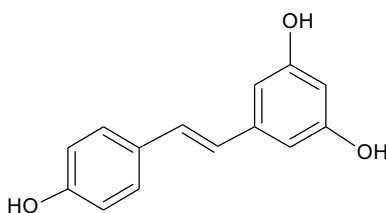
Tūkstoši fenolu savienojumu tika identificēti. Tie var atrasties koksnē gan brīvā veidā, gan kā sekundārie metabolīti, kuri rodas hidrolītiskās reakcijās ekstrakcijas procesā paaugstinātas temperatūras rezultātā. Tas izskaidro lignīna struktūru, kas sastāv no fenilpropāna vienībām. Fenolus izdala ar organiskajiem šķīdinātājiem un sārnu ūdens šķīdumiem.

Polifenolu savienojumiem ir liela nozīme - tie nodrošina aizsardzības mehānismu augos. Tiek nodrošināta aizsardzība pret zālēdājiem, kukaiņiem, mikroorganismiem, UV starojumu, kā arī pret citiem augiem. Šie savienojumi ir atjaunojami - rodas nepārtraukti līdz ar augu biomasu [36]. Polifenolu savienojumiem ir augsta antioksidantā aktivitāte, līdz ar to tie ir ļoti vērtīgi arī cilvēku organismam. Kā antioksidantu izejvielām augu biomasas atlikumiem pēdējā laikā tiek pievērsta īpaša uzmanība - ir daudz avotu, kuri ir bagāti ar šiem savienojumiem, piemēram, vīna darītavu, vīnogu un olīvu pārstrādes notekūdeņi [37].

Lignāni. Par lignāniem sauc polifenolu dabas augu ekstraktvielas. Tās izdala no augu audiem, izmantojot sekojošus šķīdinātājus - karsts ūdens, polāri šķīdinātāji (piemēram, etanols), ēteri, aromātiskie ogļūdeņraži, sārmi. Gan pēc nosaukuma, gan pēc to struktūras lignāni ir

radniecīgi lignīnam [38]. Abu savienojumu struktūras pamatā ir metoksilētas fenilpropāna vienības, taču lignīnā šīs vienības ir saistītas lielmolekulārā struktūrā, savukārt lignāni ir dimēri fenilpropāni [39]. Mūsdienās tiek aktīvi veikti šīs grupas bioloģiskie pētījumi. Tika atklāts, ka lignāni uzrāda spēcīgu pretiekaisumu, pretvīrusu, antioksidantu efektu un potenciālu kā pretvēžu līdzekļu radīšanai, kā arī tika konstatēts, ka šie savienojumi nav genotoksiski [40].

Stilbenoīdi. Augu biomasas sekundāros metabolītus, hidroksilētus stilbēnu atvasinājumus, kuru pamatstruktūru veido 1,2-difeniletilēna vienība (C₆-C₂-C₆), sauc par stilbenoīdiem. Šiem savienojumiem ir raksturīga maza molekulmasa - tikai 200 - 300 g·mol⁻¹. Stilbenoīdiem ir liela loma augu aizsargfunkcijā - šie savienojumi aizsargā pret vīrusu un mikrobu infekcijām, dažādām augu slimībām un pārāk lielu UV starojumu. Šīs grupas savienojumi tiek plaši lietoti veselības veicinošu līdzekļu ražošanā, jo tiem piemīt augsta antibakteriālā un pretmikrobu aktivitāte. Par nozīmīgāko šīs grupas pārstāvi var uzskatīt resveratrolu (skatīt 1.7. attēlu) - tam piemīt pretvēža, pretiekaisuma un augsta antioksidantā aktivitāte [41].



1.7. att. Resveratrola struktūrformula [42]

Flavonoīdi un tanīni. Tanīni (jeb miecvielas) un flavonoīdi ietilpst koksnes un mizu ekstraktvielu sastāvā. Tie ir sekundārie metabolīti, kuri ir sastopami visās augu daļās. Tanīni ir visplašāk izplatīti fenola savienojumu augu valstī, pārsvarā ir sastopami koku un krūmu mizās, kā arī koksnē. Tos ekstrahē ar ūdeni. Tanīni un flavonoīdi aizsargā pret ultravioleto starojumu, patogēniem un zālēdājiem. Tie labi šķīst ūdenī, spirtos un acetonā.

Tā kā tanīniem piemīt miecējošas īpašības, tie tiek plaši izmantoti medicīnas un rūpniecības nozarēs. Paaugstināts tanīnu saturs augos norāda uz auga stresa līmeni, jo tanīni tiek sintezēti kā atbildes reakcija augā, liecinot par apkārtējās vides nelabvēlīgo ietekmi uz to. Tanīni ir dabiskie antioksidanti gan vīnā, gan sulās un citos pārtikas produktos [43]. Tanīni, pēc savas bioloģiskās aktivitātes ir līdzīgi vitamīnam P. Pārtikā tanīnus jeb E181 izmanto kā pārtikas piedevu – stabilizētāju, emulgatoru, krāsvielu (no gaiši dzeltenās līdz brūnai krāsai). Medicīnā tanīnus izmanto, pateicoties to asins apturošai, antibakteriālai, pretiekaisuma iedarbībai, kā arī spējai saistīt smago metālu sāļus un toksīnus. Visaugstākais tanīnu saturs ir

tropiskajā kvebraho kodolkoksnē (*Schinopsis Loventzili*) - 20%. Latvijā kā mиеcvielu izejmateriālus var izmantot egles mizu (*Picea excelsa*) [44].

Tanīnus iedala [45]:

- Hidrolizējamie tanīni – cukuru un fenolskābju esteri
- Kondensētie tanīni

Hidrolizējamus tanīnus iedala:

- Galotanīdi – hidrolizējoties veido galluskābi un digalluskābi
- Ellagotanīdi – hidrolizējoties veido ellaguskābi.

Flavonoīdi ir viena no lielākām fenolu savienojumu klasēm, kurai ir raksturīga struktūras dažādība, augsta bioloģiskā aktivitāte un zema toksicitāte. Tie ir ūdenī šķīstoši savienojumi, parasti dzeltenā, oranžā vai sarkanā krāsā. Plaša flavonoīdu bioloģiskās aktivitātes amplitūda ir saistīta ar to ķīmisko struktūru un fizikāli - ķīmisko īpašību daudzveidību, kura vēl nav pilnībā izpētīta [46]. Flavonoīdi pozitīvi ietekmē sirds un asinsvadu sistēmu, regulē holesterīna līmeni asinīs, asinsvadu tonusu, spiedienu un asins recekļu veidošanos, kā arī tiem piemīt pretiekaisuma iedarbība [47]. Tiek veikti pētījumi par flavonoīdu ietekmi uz vēža šūnām – ir pierādīts, ka tie inhibē vēža šūnu augšanu un palēnina to dalīšanos [48].

1.4. Augu biomasas paraugu sagatavošana

Reprezentatīvu rezultātu iegūšanai ir nepieciešama pareiza paraugu ievākšana, to tālākā sagatavošana analizēm un uzglabāšana. Nepareizi ievācot paraugus tiek iegūts kļūdainš priekšstats par visu analizējamo paraugu. Svarīgi ir jau pirms paraugu ievākšanas skaidri zināt, kāds ir darba mērķis un kādām vielu klasēm rezultātā jābūt identificētām. Kā jau tika pieminēts 1.3. sadaļā, lignocelulozes biomasas sastāvs ir atkarīgs gan no auga tipa un sugas, bet arī no vecuma, augšanas stadijas, analizējamās augu daļas, klimata, augsnes un citiem faktoriem.

Pie paraugu sagatavošanas varētu attiecināt tā smalcināšanu un žāvēšanu. Parauga smalcināšana ir nepieciešama tā homogenitātei, lai nodrošinātu lielāku saskares virsmu un ātrāku šķīdinātāja piekļuvi materiālam. Parasti ekstrakcijai lieto paraugu ar daļiņu izmēru 0,25-2 mm – šis daļiņu izmērs ir pietiekošs, lai samazinātu difūzijas attālumu un paātrinātu masas pānesi. Tomēr nedrīkst apgalvot, ka pie mazākiem daļiņu izmēriem tiks panākta efektīvāka ekstrakcija – ekstrahējot paraugu ar ļoti mazu daļiņu izmēru ir zināms risks zaudēt viegli gaistošos savienojumus. Turklāt, pārāk mazs daļiņu izmērs var apgrūtināt pašu ekstrakcijas procesu, piemēram, strādājot ar ASE, kad šķīdinātāja plūsma ar spiedienu netiek cauri paraugam tā sablīvēšanas dēļ, kā arī, parauga sīkākai smalcināšanai ir dārgākas izmaksas.

Mitruma, kurš ir analizējamajā paraugā, var traucēt tā analīzei un izraisīt pelējumu, tāpēc ir nepieciešams no tā tikt vaļā - paraugu žāvējot gaisā, istabas temperatūrā. Mitruma saturs koksnē robežās no 6 līdz 14 % netraucē tās analīzēm [49].

Paraugi jāuzglabā pazeminātā temperatūrā, lai izvairītos no bioloģiskām, fizikālām vai ķīmiskām izmaiņām. Īsai parauga uzglabāšanai var izmantot aukstu istabu vai ledusskapi, taču ilgākam laikam - saldētavu. Lai saglabātu jūtīgus paraugus bez izmaiņām, ir nepieciešams tos sasaldēt un uzglabāt -80 °C temperatūrā. [50].

1.5. Augu biomasas ekstrakcija

Mūsdienās eksistē daudzas biomasas ekstrakcijas metodes, kuras savā starpā atšķiras ar šķīdinātāja izvēli un tā tilpumu, ekstrakcijas ilgumu un nepieciešamo aparatūru. Ekstrakcijas veida izvēle ir atkarīga no biomasas veida un no savienojumiem, kurus vēlas no analizējamās biomasas izdalīt. Izvēloties ekstrakcijas metodi, ir jāpievērš uzmanība sekojošiem faktoriem: metodei jābūt mērķsavienojumu selektīvai, ātrai, vienkāršai, lētai, videi draudzīgai un pēc iespējas automatizētākai. Izplatītākās biomasu ekstrakciju veidi ir [51]:

- Šķidrās fāzes ekstrakcija ekstrakcija
- Cietās fāzes ekstrakcija (SPE)
 - Macerācija
 - Soksleta ekstrakcija
 - Ekstrakcija ultraskaņas tehnikā (UE)
 - Ekstrakcija mikroviļņu tehnikā (ME)
 - Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (ASE)
 - Ekstrakcija ar sašķidrinātu gāzi
 - Ekstrakcija ar jonu šķīdriem
 - Ekstrakcija virstošā slānī (FBE)
 - Ar sauso ledu

Šķidrās fāzes ekstrakcija. Šai metodei izmanto divus dažādus šķīdinātājus, kas savā starpā nejaucas. Viens no šķīdinātājiem ir ūdens, bet otrs - dihlormetāns, heksāns un citi. Lai arī šī ekstrakcijas metode ir visvienkāršākā un visām un tiek plaši lietota mūsdienās, tai ir būtiski trūkumi: liels dārgu šķīdinātāju patēriņš, toksiskums un ugunsbīstamība [52].

Cietās fāzes ekstrakcijas metodes. Cietās fāzes ekstrakcijas metodes tiek lietotas, lai izdalītu izšķīdušos vai suspendētus analītus no šķīduma maisījuma. Trūkumi dažām cietās fāzes ekstrakcijas metodēm ir sekojoši: laiktīlīgs process, vides piesārņošana ar kaitīgiem

šķīdinātājiem un augstās temperatūras ietekme, kura var novest pie termiski nestabilu metabolītu degradācijas [53].

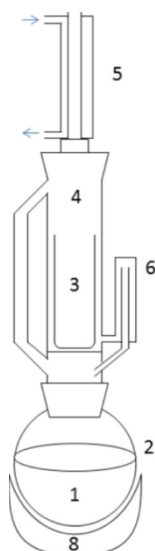
Macerācija. Macerācija ir visvienkāršākā un vislētākā ekstrakcijas metode no visām eksistējošām. Metodes būtība balstās uz vairākkārtēju cietas, sasmalcinātas vielas ekstrakciju ar nelielu šķīdinātāja porciju. Ir trīs macerācijas veidi: vienkāršā macerācija (istabas temperatūrā), macerācija paaugstinātā temperatūrā un perkolācija (angliski – *percolation*).

Vienkāršā macerācija notiek, paraugu vairākas reizes nostādinot nelielā tilpumā šķīdinātāja istabas temperatūrā, kam seko ekstrahenta filtrēšana, savukārt macerācija paaugstinātā temperatūrā notiek, maisījumu karsējot. Perkolācija notiek, šķīdinātāju laižot cauri ekstrahējamai vielai caur smalku filtru. Perkolācijas process sastāv no trīs etapiem: materiāla uzbriešana ar šķīdinātāju, nostādināšana un pati perkolācija. Ekstrakcijas iznākums visos trīs gadījumos ir atkarīgs no izvēlētā šķīdinātāja, parauga maisīšanas, ekstrakcijas ilguma un no tā, cik sīki ir sasmalcināta izejviela. Lai iznākums būtu lielāks, ir nepieciešams atkārtot procesu vairākas reizes.

Trūkumi šai metodei ir sekojoši: laikietilpīgs process (macerācija var ilgt līdz pat vairākām diennaktīm) un, protams, liels šķīdinātāju patēriņš, kas nav videi draudzīgi. Par macerācijas priekšrocībām noteikti var uzskatīt šīs metodes vienkāršību - tai ir nepieciešama tikai izejviela, šķīdinātājs, kolba un filtrs; macerācijas pie paaugstinātas temperatūras gadījumā – papildus ir nepieciešama elektriskā plīts, bet perkolācijai – perkolācijas ekstraktors [54].

Soksleta ekstrakcija. Tā ir samērā vienkārša cietās fāzes ekstrakcijas metode, kura tiek plaši izmantota organisko savienojumu ekstrakcijai no augu biomasas. Soksleta aparātam ir vienkārša un saprotama konstrukcija (skat. 1.8. attēlu). Tas sastāv no kolbas, Soksleta ekstraktora un dzesinātāja. Ekstrakcija notiek nepārtraukti – šķīdinātāju uzsildot līdz tā vārīšanas temperatūrai, tā tvaiki nokļūst attecēs dzesinātājā, atdzesējas un tek cauri ekstrahējamai masai - šādi tiek panākta vairākkārtēja biomasas ekstrakcija ar tīru šķīdinātāju. Tiklīdz sifona caurule ir piepildījusies ar šķīdinātāju, tas nonāk atpakaļ kolbā un ekstrakcija turpinās. Šādā veidā ekstrahējot biomasu, nav nepieciešama parauga filtrēšana, jo paraugs atrodas ekstrakcijas patronā. Pēc ekstrakcijas šķīdinātājs ir jānodestilē, un tas var tikt lietots atkārtoti.

Ekstrakcijas ilgums ir atkarīgs no daudziem faktoriem, taču vidēji tas ilgst 6 - 24 stundas, kas ir ļoti laikietilpīgs process. Pie trūkumiem šai metodei varētu attiecināt ne tikai ilgu procesu, arī iespējamu mērķsavienojumu termisko sadalīšanos, kā arī lielu ūdens patēriņu ekstrakcijas laikā, kas ir nepieciešams šķīdinātāja atdzesēšanai [55].



1.8. att. Soksleta aparāts: 1 – šķīdinātājs; 2 – apaldibena kolba; 3 – Soksleta uzmava; 4 – Soksleta ekstraktors; 5 – atteces dzesinātājs; 6 – sifons [56]

Ekstrakcija ultraskaņas tehnikā. Šī metode ir nedārga, vienkārša, un efektīva alternatīva tradicionālām ekstrakcijas metodēm; ar ultraskaņas palīdzību tiek samazināts ekstrakcijas laiks, un palielināts ekstrakcijas iznākums no 3 līdz 20 reizēm, salīdzinot ar macerāciju. UE plaši izmanto bioloģiski aktīvo vielu ieguvei no augu biomasas – farmācijā, kosmētikas un pārtikas ražošanā.

Ultraskaņas ietekmē rodas kavitācija (burbuļu veidošanās) un turbulentā plūsma (nesakārtots plūsmas režīms) šķidrājā ekstrahentā, kā rezultātā notiek ātra materiāla uzbriešana un šūnas satura šķīšana, paātrinās tā daļiņu aptecēšana. Kavitācijas rezultātā notiek šūnu struktūras sabrukšana, līdz ar to mērķsavienojumu pāreja ekstrahentā notiek ātrāk. Spēcīgas turbulentās plūsmas sekmē masas pārnesi, vielu šķīšanu un intensīvu maisīšanu pat šūnas iekšienē, ko nevar panākt ar citām ekstrakcijas metodēm. Mērķsavienojumu iznākums ir atkarīgs no ultraskaņas iedarbības ilguma un intensitātes, ekstrahenta temperatūras, materiāla daļiņu izmēra, kā arī no tā, kāda ir šķīdinātāja un izejmateriāla attiecība.

Galvenās metodes priekšrocības – ekstrakcija nenotiek augstās temperatūrās (parasti līdz 60 °C), kas var izraisīt savienojumu termisko sadalīšanos; samērā ātrs process (vidēji 30 - 45 minūtes); pilnīgāka savienojumu ekstrakcija no izejmateriāla; zema iekārtas cena [57].

Ekstrakcija mikroviļņu tehnikā. ME ir samērā jauna ekstrakcijas metode – tā tiek izmantota augu biomasas ekstrakcijai kopš 1980. gada. Šī metode kombinē sevī klasisko un ekstrakciju mikroviļņu tehnikā. Mikroviļņu enerģija ir augstas frekvences elektromagnētiskie viļņi, kuri atrodas starp radio frekvencēm un infrasarkano starojumu (0,3 – 300 GHz) elektromagnētisko starojumu spektrā. Tas ir nejonizējošais starojums, kura iedarbības rezultātā

notiek molekulu kustība, migrējot joniem un rotējot dipoliem. Molekulārā struktūra netiek mainīta, ja vien temperatūra nav pārāk augsta [58].

ME procesā parauga sildīšana notiek, mikroviļņiem iedarbojoties uz polārām molekulām. Jonu vadītspējas dēļ, mikroviļņiem iedarbojoties, joni šķīdumā migrē. Dipoliem iedarbojoties ar mikroviļņiem, tie jau pie mazākām frekvencēm rotē $4,9 \cdot 10^9$ reizi sekundē. Šķīdumam pretoties jonu un molekulu plūsmai rodas berzes efekts, kas, savukārt, rada siltumu. Šādi iedarbojoties uz vielu, tā sildīšana notiek nevis no ārpusē, kā tas notiek klasiski, bet gan tās iekšienē, pakāpeniski siltumam izplatoties uz āru. Šī iemesla pēc nepolāri šķīdinātāji, piemēram, heksāns un toluols, nepakļaujas iedarbībai ar mikroviļņiem, līdz ar to ir nepieciešams tiem pievienot polāras vielas [59].

Efektīvai ME ir nepieciešams pareizi izvēlēties šķīdinātāju: šķīdinātājam ir jābūt polāram (visbiežāk kā šķīdinātājus lieto etanolu, acetonu un metanolu, kā arī to kombinācijas ar ūdeni), tam ir jābūt mērķsavienojumu selektīvam un ar mikroviļņu absorbēšanas spējām. Svarīgi ME ekstrakcijā ir ņemt vērā attiecību izejviela: šķīdinātājs, lai ekstrahējamā viela būtu pilnībā iegremdēta šķīdinātāja arī pēc tās uzbriešanas [60].

Ekstrakcijai mikroviļņu tehnikā ir vairākas priekšrocības, salīdzinot ar citām ekstrakcijas metodēm: produktu stabilitāte, ekstraktu tīrība, iespēja lietot mazāk toksiskus šķīdinātājus, samazināts šķīdinātāju un enerģijas resursu patēriņš, diezgan ātrs process (parasti aizņem līdz 30 minūtēm) un salīdzinoši lieli ekstraktu iznākumi. Pie metodes trūkumiem jāpiemin termiski nestabilu savienojumu destrukciju pie augstās jaudas ME, kā rezultātā ekstraktu iznākumi kļūst mazāki [61].

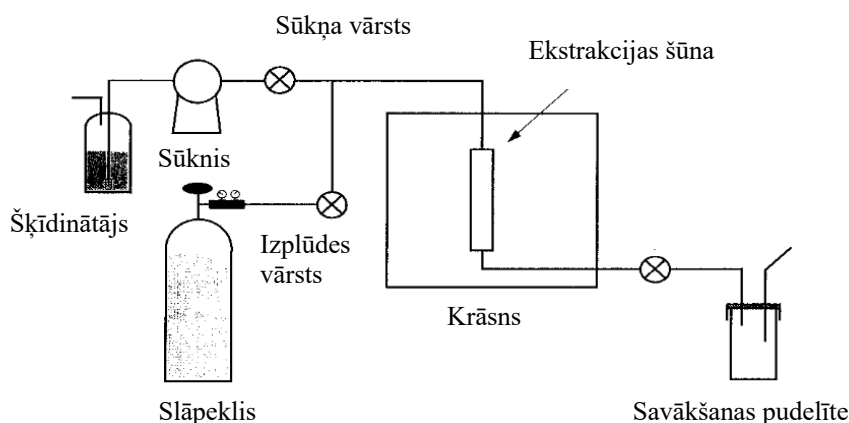
Eksistē divi ME paveidi: spiediena ekstrakcija mikroviļņu tehnikā (angliski – *Pressurized microwave – assisted extraction* jeb PMAE) ekstrakcija mikroviļņu tehnikā bez šķīdinātāja (angliski – *Solvent – free microwave – assisted extraction* jeb (SFMAE)), taču tās nav tik izplatītas. Viens no ražotājiem, kas nodarbojās ar šāda tipa iekārtu ražošanu ir *Milestone SRL*, kam ir 4 dažāda tipa ekstrakcijas iekārtas mikroviļņu tehnikā. Šāda tipa iekārtas ir vienkāršas lietošanā, videi draudzīgas, nenotiek savienojumu termiskā degradācija, ekstrakti tiek iegūti tīri, bet rezultāti ar labu reproducējamību [62].

Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (angliski - *Accelerated solvent extraction* jeb ASE) ir viena no jaunākām ekstrakcijas metodēm. ASE ļauj automatizēt un paātrināt organisko savienojumu ekstrakcijas laiku no cietām matricām. Izmantojot paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas metodi ir iespējams ietaupīt līdz pat 90 % šķīdinātāja un samazināt ekstrakcijas laiku desmitiem reizi, salīdzinājumā ar klasiskām ekstrakcijas metodēm.

Ekstrakcijas process notiek paaugstinātas temperatūras un paaugstināta spiediena apstākļos, kas ļauj šo metodi izmantot virs šķīdinātāju viršanas temperatūras, saglabājot tos

šķidrā agregātstāvoklī. Paaugstināta temperatūra un spiediens pavājina ūdeņraža saites un atvieglo iekšmolekulāro spēku pārraušanos, kā rezultātā šķīdinātāja iekļūšana vielas matricā notiek ātrāk un vieglāk. Visbiežāk ekstrakcija notiek temperatūrā no 50 – 200 °C, spiedienā līdz – 1700 psi (11721 kPa) , 5 – 10 minūtes katram ciklam. Ekstrakcijas šūnu, kurā ir ielikts filtrs un iepildīts ciets biomasas paraugs, ievieto krāsnī. Šķīdinātājs tiek pumpēts no rezervuāra un iepildīts ekstrakcijas šūnā, kurai ir ieprogrammēta noteikta temperatūra, spiediens un ekstrakcijas laiks. Šūna tiek “izskalota” ar slāpekli, un automātiski nofiltrēts ekstrakts nokļūst paraugu savākšanas pudelītē. Svaigu šķīdinātāja porciju izmanto, lai izskalotu šūnu, kam seko šūnas mazgāšana ar slāpekli - tā ir nepieciešama, lai izžāvētu biomasu šūnā. ASE var izmantot secīgi no 1 līdz 3 šķīdinātājiem (virzienā no nepolārākā uz polārāko), kā arī ir iespēja ieprogrammēt ekstrakciju ciklu skaitu [63]. ASE shēmu skatīt 1.9. attēlā. Efektīvākai ekstrakcijai tās parametri ir jāpielāgo un jānosaka katram paraugam atsevišķi.

Uz doto brīdi Latvijā ir tikai divas paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas iekārtas Dionex ASE 350 – Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūtā (KĶI) un Latvijas Vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas centrā (LVĢMC).



1.9. att. Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas (ASE) shēma [64]

Ekstrakcija ar sašķidrinātu gāzi. Vēl 19. gadsimta beigās kļuva zināms, ka daudzas gāzes, temperatūrā, kas ir augstāka par kritisko un pie paaugstināta spiediena, spēj izšķīdināt sevī dažādus savienojumus. Visbiežāk ekstrakcijai izmanto oglekļa dioksīdu (CO₂), propānu (C₃H₈), butānu (C₄H₁₀), hloru un fluoru saturošus ogļūdeņražus (aukstuma aģenti, C(H,Cl,F)_{2n+2}). Sašķidrinot šīs gāzes, tās kļūst bezkrāsainiem šķidrums, kuri šķīst organiskajos šķīdinātajos, bet praktiski nešķīst ūdenī. Sašķidrināto gāzu viskozitāte ir krietni mazāka par citu organisko savienojumu viskozitāti, kas paaugstina ekstrakcijas efektivitāti. Tās ir inertas pret ekstrahējamām vielām un aparāturu, nav toksiskas, neveido sprādzienbīstamus

maisījumus ar gaisu un ir ugunsdroši (izņemot propānu un butānu). Pateicoties tam, ka ekstrakcija notiek salīdzinoši zemās temperatūrās, ir iespēja iegūt termiski nestabilus savienojumus.

Doma par augu biomasas ekstrakciju, izmantojot gāzes, parādījās jau sen, taču joprojām šī ekstrakcijas metode ir izpētīta ļoti mazā mērā. Tas ir skaidrojams ar to, ka augsta spiediena izmantošana gan laboratorijas, gan rūpnīcas apstākļos sākās salīdzinoši nesen. Ekstrakcijā ar sašķidrinātām gāzēm var variēt ar termodinamiskiem parametriem (biežāk – temperatūra un spiediens), kas ietekmē ekstrahējamo vielu sastāvu. Sašķidrinātas gāzes kā šķīdinātāji bioloģiski aktīvo lipofīlo vielu ir nepietiekami izpētīti, taču tām ir liela perspektīva pārtikas, farmācijas un kosmētikas rūpniecībā [65].

Gāzes sašķidrināšana - vielas pāreja no gāzes uz šķidro agregātstāvokli notiek to atdzesēšanas zem kritiskās temperatūras (T_k) un tālākas kondensēšanās rezultātā. Dzesēšana zem T_k ir nepieciešama, lai sasniegtu termodinamisko stāvokli, kurā gāze spēj sakondensēties superkritiskajā šķīdumā. Šādiem šķīdumiem viskozitāte ir līdzīga gāzēm, taču blīvums – šķīdumam.

Ekstrakcija ar sašķidrinātu butānu. Šī ir jauna ekstrakcijas metode, kura tiek pētīta kā alternatīva metode lipofīlo savienojumu ekstrakcijai ar n-heksānu. Sakarā ar heksāna toksiskumu, ir nepieciešams atrast alternatīvu ekstrakcijas metodi, ko varētu pielietot pārtikas un medicīniskiem nolūkiem.

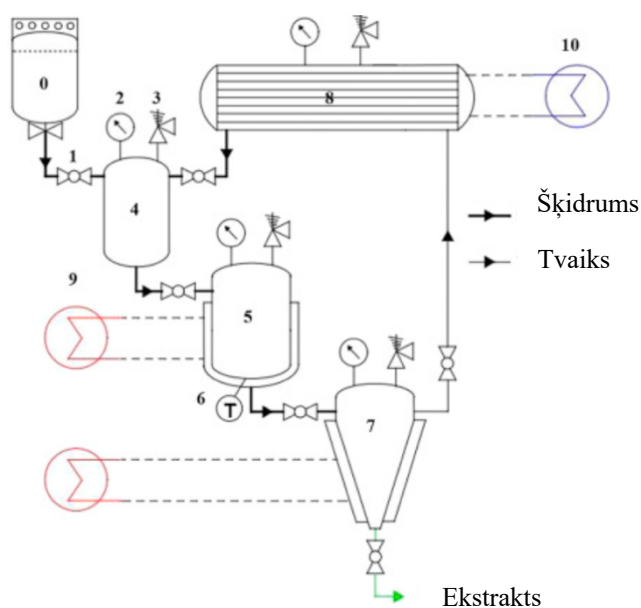
Heksāns tiek plaši lietots lipofīlo savienojumu iegūšanai – tam ir zema viršanas temperatūra, zema polaritāte, tas ir ķīmiski stabils, taču tas ir toksisks un tā pārpalikumi produktos var izraisīt veselības problēmas (alerģija, centrālās nervu sistēmas traucējumi, reproduktīvās sistēmas traucējumi, ekzēmas, elpceļu kairināšana). Par iespējamu alternatīvu n-heksānam tika izvēlēts butāns šo faktoru dēļ: tam ir salīdzinoši zema cena, neliels tvaiku spiediens, tas nav toksisks, to ķīmiskās struktūras ir līdzīgas, kā arī n-butāns ir klasificēts kā šķīdinātājs, ko var izmantot bez ierobežojuma pārtikas ražošanā. Butāna ekstrakcijai ir būtisks trūkums – gāze ir viegli uzliesmojoša un sprādzienbīstama, līdz ar to ir jāievēro stingri darba drošības noteikumi ar to strādājot [66].

Literatūras avotā [67] tika aprakstīta ekstrakcijas metode ar sašķidrinātu n-butānu trīs paraugiem: žāvēti burkāni, saulespuķu sēklas un ķīmeņu sēklu pulveris. Ekstrakcija notiek iekārtā, kuras shematiskais attēlojums ir redzams 1.10. attēlā. Filtrēšanas maisu (porainība 50 μm) ar paraugu (75 g) ievieto ekstraktorā (5). Tālāk visa ierīce tiek ievietota vakuumā, lai atbrīvotos no skābekļa. No n-butāna pudeles (0), tas, šķidrā agregātstāvoklī, tiek pārvietots uz uzglabāšanas tvertni (4). Aptuveni 1,5 L sašķidrināta n-butāna tiek ievadīti ekstraktorā zem spiediena (200 kPa, 20 °C). Ekstraktoru silda 2 stundu laikā izvēlētajā temperatūrā (20, 30 vai

40 °C). Pēc divu stundu ilgas ekstrakcijas, šķīdinātājs kopā ar ekstraktu tiek pārvests uz iztvaicētāju (7), kur tas tiek iztvaicēts. Šķīdinātāja tvaiki nonāk kondensatorā (8), kur tiek atdzesēti 0 °C temperatūrā. Ekstrakts no iztvaicētāja tiek savākts kolbā, izšķīdināts 100 mL heksānā un uzglabāts 4 °C temperatūrā līdz tā analīzēm.

Rezultātu savstarpējai salīdzināšanai, tiem pašiem paraugiem tika veikta atces ekstrakcija ar n-heksānu. 10 g parauga tika ievietoti kolbā ar 100 mL n-heksāna. Maisījumu karsē 2 stundas 68 °C temperatūrā, atdzesē līdz istabas temperatūrai, filtrē (1.6 μm), un n-heksānu atdestilē rotācijas ietvaicētājā (40 °C; 15 kPa). Ekstrakts tika uzglabāts 4 °C temperatūrā līdz tā analīzēm.

Iegūtie ekstrakti tika analizēti ar augsti efektīvo šķīdumu hromatogrāfiju (HPLC), ultravioleto (UV) spektroskopiju un gāzes hromatogrāfiju (GC). Pētījums parādīja, ka ekstrakti ir kvalitatīvi ekvivalenti, taču kvantitatīvi n-heksāna ekstrakta iznākums ir lielāks, salīdzinot ar n-butāna ekstraktu. Saulespuķu sēklām n-butāna un n-heksāna oleosveķu ekstraktu iznākumi sanāca attiecīgi 36,9 % un 53,4 %, 10,9 % un 15,0 % ķīmeņu sēklām un 25,7 % un 55,8 % burkāniem.



1.10. att. Iekārta ekstrakcijai ar sašķīdinātu gāzi (NECTACEL®): 0 – n-butāna pudele; 1 – vārsts; 2 – manometrs; 3 – drošības vārsts; 4 – šķīdinātāja uzglabāšanas tvertne; 5 – dubultsienu nerūsējošais ekstraktors; 6 – termometrs; 7 – dubultsienu nerūsējošais iztvaicētājs; 8 – nerūsējošais kondensators; 9 – sildīšanas vannas cirkulators; 10 – dzesēšanas vannas cirkulators [67]

Ekstrakcija ar freoniem. Meklējot videi draudzīgākas biomasas ekstrakcijas metodes, tika atklāts, ka ir iespējama izmantot dzesēšanas līdzekli R134a kā iespējamu alternatīvu

ekstrakcijām ar biežāk lietojamiem šķīdinātājiem – heksāns, etanols, acetons un citiem. R134a ir visā pasaulē plaši lietojams aukstuma aģents, kas tiek izmantots gaisa kondicionēšanas un saldēšanas iekārtās; gaisa un transportlīdzekļu kondicionieros, rūpnieciskās iekārtās. Tas nav toksisks, nav sprādzienbīstams – pieder pie A1 drošības klases, neizraisa ozona slāņa noārdīšanos (*ozone depletion potential* jeb ODP = 0), taču tam ir ļoti liels globālās sasilšanas potenciāls (*global warming potential* jeb GWP) – 1430.

Kā alternatīva R134a izmantošanai tika pētīts HFO1234ze (1,3,3,3-tetrafluoropropēns) – jaunas paaudzes aukstuma aģents ar ievērojami mazāku GWP – tikai 6. HFO1234ze pieder pie A2L drošības klases, kas nozīmē, ka tam ir zema toksicitāte un zema uzliesmojamība. Abu aukstuma aģentu īpašību salīdzinājums ir atspoguļots 1.2. tabulā.

1.2. tabula

R134a un HFO1234ze īpašību salīdzinājums [68]

Aukstuma aģents	R134a	HFO1234ze
Ķīmiskā formula	CH ₂ FCF ₃	CHF=CHCF ₃
Molekulārā masa	102,03	114,04
Kritiskā temperatūra (°C)	101,1	79,0
Kritisks spiediens (bar)	40,59	36,32
Viršanas temperatūra (°C)	-26,0	-20,0
Drošības klase	A1	A2L
ODP	0	0
GWP	1430	6

Literatūras avotā [69] tika aprakstīts ekstrakcijas process, kas ir identisks tam, kas bija minēts iepriekš par ekstrakciju ar sašķidrinātu bûtanu. Vienīgā atšķirība – ekstraktoram tika pievienots magnētiskais maisītājs, lai nodrošinātu šķīdinātāja vieglāku piekļuvi materiālam. Eksperimentam izmantoja sekojošus paraugus: žāvētus burkānus, rapšu sēklas, olīvu un rozmarīnu lapas.

Rezultātu salīdzināšanai, tika veiktas ekstrakcijas paraugiem ar biežāk izmantotiem šķīdinātājiem:

- atteces ekstrakcija ar n-heksānu, izmantojot 10 g izejmateriāla un 100 mL šķīdinātāja, maisījumu karsējot 2 stundas 68 °C temperatūrā – rapšu sēklām un burkāniem;
- macerācija, izmantojot etanola/ūdens (80:20) maisījumu. 10 g izejmateriālam pievieno 100 mL šķīdinātāja, maisījumu karsē 60 °C temperatūrā 1 stundu – olīvu lapām;

- atteces macerācija, izmantojot 83,5 g izejmateriāla un 500 mL acetona, maisījumu karsējot 56 - 60 °C temperatūrā 1 stundu – rozmarīnu lapām.

Iegūtie ekstrakti tika analizēti ar HPLC, HPLC ar UV detektoru, HP-TLC un spektrofotometru. Ekstrahējot paraugus, visos gadījumos ekstrakcijas kinētika bija ievērojami mazāka izmantojot HFO1234ze kā šķīdinātāju, turklāt to ekstrakti nav tik kvalitatīvi bagāti. Lipofilo savienojumu izdalīšana ar 1,3,3,3-tetrafluoropropēnu no augu biomasas ir daudz veiksmīgāka par organisko skābju un polifenolu savienojumu iegūšanu gan kvalitatīvā, gan kvantitatīvā nozīmē. Var secināt, ka ekstrakcija ar HFO1234ze ir piemērota metode lipofilo savienojumu iegūšanai no augu biomasas. Salīdzinot ar n-heksāna ekstrakciju, tā ir ilgāka, ar mazākiem iznākumiem, taču videi draudzīgāka metode.

Superkritiskā CO₂ ekstrakcija. Sašķidrināts oglekļa dioksīds tiek plaši izmantots bezalkoholisko dzērienu, dzirkstošo vīnu un alus ražošanā un kā līdzeklis dažādu ādas slimību ārstēšanas medicīnā. Aptuveni 90 % no visām ekstrakcijām ar superkritiskiem šķīdumiem tiek veiktas ar oglekļa dioksīdu (CO₂), piemēram, kofeīna ekstrahēšana no kafijas pupiņām un nikotīna ekstrahēšana no tabakas [70].

Parasti oglekļa dioksīdu iepilda ekstraktorā šķidrā agregātstāvoklī, 5 °C temperatūrā un 5000 kPa spiedienā. Ekstrakcijas apstākļi visbiežāk ir 31 °C temperatūra un spiediens sākot no 7400 kPa, taču dažkārt ir nepieciešams paaugstināt spiedienu līdz 80000 kPa [71]. Ekstraktu iznākumi katram biomasas paraugam pie vienādas temperatūras ir atšķirīgi, kas liecina par to, ka šķīdība un difūzijas koeficienti komponentiem, kas ietilpst ekstrakta sastāvā, temperatūras un spiediena ietekmē mainās nevienmērīgi. Biomasas mitrumam jābūt līdz 5 %, citādi ekstrakcijas process ir apgrūtināts [72].

Par metodes priekšrocībām uzskata ātru un videi draudzīgu procesu ar analītiski tīriem iznākumiem. Turklāt, nav nepieciešama šķīdinātāja atdestilēšana, jo tas iztvaiko, pazeminot temperatūru un/vai spiedienu. Ir iespēja arī variēt ar ekstrahējamo vielu sastāvu, piemēram, mainot šķīdinātāja polaritāti, tam pievienojot metanolu. Par metodes trūkumiem uzskata dārgu aparāturu, kas ir saistīts ar ekstrakcijas apstākļiem, kas notiek pie ļoti augsta spiediena. Vēl viens trūkums metodei ir tas, ka superkritiskā CO₂ ekstrakcija var kalpot kā alternatīva tikai nepolāriem šķīdinātājiem, piemēram, n-heksānam [73].

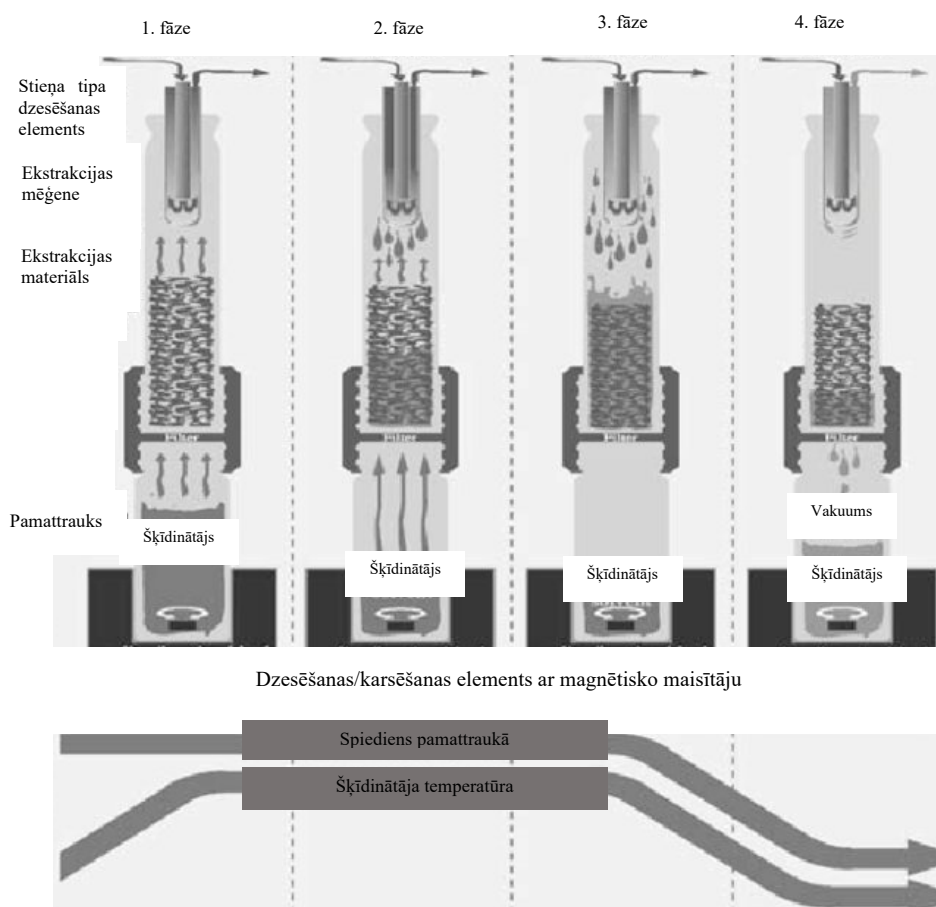
Ekstrakcija virstošā slānī. Šī metode ir alternatīvā metode ekstrakcijai Soksleta aparātā; tā ir ātrāka un automatizētāka. Virstošā slāņa ekstrakcijai ir mazāks šķīdinātāja un laika patēriņš un labāka atkārtokamība. Virstošā slāņa ekstrakcijas shēma ir attēlota 1.11. attēlā.

Ekstrakcija notiek 4. fāzēs:

1. Nosvērtu biomasas paraugu ievieto ekstrakcijas mēģenē. Šķīdinātāju iepilda pamattraukā, tajā ievieto magnētisko maisītāju. Uz pamattrauka nostiprina

ekstrakcijas mēģeni un ieslēdz dzesēšanas elementus. Ekstrakcijas parametri (temperatūra, ciklu skaits, filtrācijas laiks) ievada programmā un sāk ekstrakcijas procesu.

2. Šķīdinātājam vāroties, tā tvaiki nokļūst līdz membrānfiltram (materiāls – PTFE, poru izmērs 10 – 20 μm) un ekstrahējamais materiāls kondensējas uz stieņa tipa dzesējošā elementa. Secīgā šķīdinātāja tvaiku plūsma uzsilda un šķīdina ekstrahējamo materiālu viršanas temperatūrā.
3. Sildīšanu izslēdz pēc uzstādītā sildīšanas perioda beigām, maisītājs turpina darboties, un, kad šķīdinātāja vārsts tiek atvērts ar programmu, dzesēšanas šķidrums tiek pievadīts caur dzesēšanas/karsēšanas elementu. Tā rezultātā notiek strauja pamattrauka un tā satura atdzesēšana.
4. Dzesēšana un kondensēšanās veido vakuumu pamattraukā, kā rezultātā rodas spiediena starpība ar atmosfēras spiedienu un notiek ekstrakta iekļuve pamattraukā caur filtru. Ekstrakcijas parametrus var pielāgot katram paraugam, izmantojot programmu [74].



1.11. att. Virstošā slāņa ekstrakcijas shematiskais attēlojums [74]

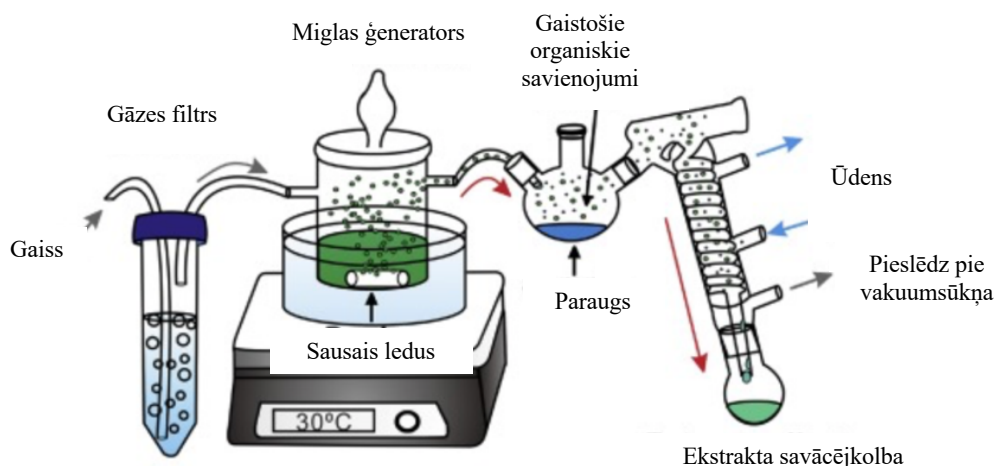
Ekstrakcija ar jonu šķidrumiem. Jonu šķidrumi kā šķīdinātāji kļūst arvien populārāki ķīmijas nozarē, pateicoties to unikālām īpašībām: pavisam neliels tvaika spiediens, termiskā stabilitāte, variējama viskozitāte un sajaukšanās ar ūdeni un organiskiem šķīdinātājiem, kā arī laba ekstrahējamība daudziem organiskiem savienojumiem un metālu joniem. Tie nav toksiski, nav gaistoši, nav sprādzienbīstami un ir videi draudzīgi, līdz ar to var tikt izmantoti kā alternatīva daudziem šķīdinātājiem perspektīvā.

Jonu šķidrumi tiek lietoti dažādiem mērķiem – jonu šķidrums kompozīto membrānu iegūšanai, kā kustīgās un nekustīgās fāzes piedeva hromatogrāfijā, kā ekstrakcijas šķīdinātājs paraugu sagatavošanā, kā kapilāru sienīņu pārklājums kapilārajā elektroforēzē un citiem nolūkiem. Jonu šķidrums var sastāvēt no dažādiem katjoniem un anjoniem, kas ietekmē to ķīmiskās un fizikālās īpašības (lielāka ietekme ir anjonam), piemēram, viskozitāti, polaritāti, hidrofilītāti un citas īpašības. Pateicoties tam, jonu šķidrumus var izmantot biomasas ekstrakcijai dažādu mērķsavienojumu iegūšanai, variējot ar to sastāvu [75].

Ekstrakcija ar sauso ledu. Gaistošo organisko savienojumu analīzei visbiežāk ir nepieciešams tos uzņemt uz cietā sorbenta, tad pārvērst šķidrā vai atpakaļ gāzes fāzē. Šo savienojumu uzņemšanu uz cietā sorbenta var panākt, izmantojot šķiedras ar īpašiem pārklājumiem, kam piemīt augsta selektivitāte uz mērķsavienojumiem, kā arī izmantojot monolītus un daļiņas ar dažādu izmēru. Gaistošo organisko savienojumu ekstrakcijai no cietās fāzes ir nepieciešams maksimāli palielināt saskares virsmas laukumu. Ekstrahējot cietās vielas, saskares virsmas laukumu var palielināt, ieviešot porainus monolītus vai daļiņas ar atšķirīgu izmēru. Šķidrās fāzes ekstrakcijas gadījumā saskares virsmu var palielināt, ieviešot aerosola mikropilienu vai mikroburbuļus [76].

Aerosola mikropilieni veidojas, ievietojos sauso ledu ekstrakcijas šķīdinātājā. Izveidojusies migla, kas satur augsta blīvuma mikropilienu, virzās uz paraugu, kur notiek gāzes – šķidrums ekstrakcija. Mikropilieni, kuri satur ekstrahētos gaistošos organiskos savienojumus, sakondensējas uz aukstas virsmas. Mikropilienu kustību atvieglo neliela spiediena starpība starp miglas ģeneratoru un ekstrakta savācējkolbu. Dažu minūšu laikā tiek iegūti daži simti miktolitri ekstrakta, kas ir pietiekami priekš hromatogrāfijas un maspektrometriskās analīzes veikšanas.

Ekstrakcijas shēmu ar sausā ledus miglu skatīt 1.12. attēlā.



1.12. att. Ekstrakcijas shēma ar sausā ledus miglu [76]

1.6. Lipofīlu ekstraktvielu analīze

GH-MS analīze. Šī ir visbiežāk lietota metode lipofīlo savienojumu noteikšanai. Ar gāzes hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodi atdala ķīmiskos maisījumus un identificē savienojumus molekulārajā līmenī. Šī ir viena no precīzākajām metodēm savienojumu noteikšanai. Metode balstās uz maisījuma sadalīšanos paaugstinātā temperatūrā. Sakarsēta gāze virzās caur kolonnu ar inertu gāzi (piemēram, hēliju). Līdz ko savienojumi nonāk no kolonnas uz MS, tas identificē savienojumus, salīdzinot to molekulu masas ar datiem no elektroniskās datu bāzes [77].

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Pētāmais paraugs

Šī darba ietvaros par pētāmo paraugu tika izvēlēta parastās priedes (*Pinus sylvestris*) miza – augstumā līdz 4 metriem no zemes un virs 4 metriem no zemes. Paraugkoks tika ievākts Ogres novadā, Mazozolu pagastā. Priedes aptuvenais vecums, spriežot pēc gadskārtu skaitīšanas uz celma, bija 76 gadi. Pēc meža tipu klasifikācijas priede auga niedrājā.

2.2. Darbā izmantotie trauki, aparatūra un reaģenti

Izmantotie trauki un aparatūra:

- Analītiskie svāri *KERN ALJ 220 - 4*, ($m_{\max} = 220 \pm 0,0001$ g);
- Elektriskā plītiņa *Sencor* ($t_{\max} = 250 \pm 5^{\circ}\text{C}$);
- Gāzes hromatogrāfs masspektrometrs - *Shimatdzu GC-MS-QP2010* ar kapilāro kolonnu RTX-1701 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm);
- Iekārta ekstrakcijai ar sašķidrinātu gāzi - *NECTACEL® 1, Celsius*;
- Liofilizācijas aparāts *Heto PowerDry PL3000* ($t_{\min} = -54^{\circ}\text{C}$, $p_{\min} =$ līdz 1 mbar);
- Mitruma ekspresanalizators *KERN MLB 50-3* ($m_{\max} = 60 \pm 0,001$ g);
- Mufelkrāsns FN 400 ($t_{\max} = 1200 \pm 1^{\circ}\text{C}$);
- Nerūsējošā tērauda ekstrakcijas šūna (66 mL);
- Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas iekārta *ASE 350 Dionex corp.* ($p_{\max} = 110 \pm 1$ atm, $t_{\max} = 200 \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- Porcelāna tīģelīši
- Rotācijas ietvaicētājs *Heidolph Instruments* ($p_{\min} =$ līdz 10 ± 1 mbar);
- 100, 250 un 500 mL apaļkolbas

Izmantotie reaģenti:

- Etilacetāts *Sigma Aldrich*, $\geq 99,0\%$, CAS No: 141-78-6;
- Etanols, $\geq 96,0\%$, CAS No:64-17-5;
- Heksāns *Sigma Aldrich*, $\geq 97,0\%$, CAS No: 2493-44-9;
- Tetrafluoretāns (R134a), SIA “Airok”.

2.3. Parauga priekšapstrāde

Iegūtos mizas paraugus žāvēja istabas temperatūrā līdz mitruma saturs nepārsniedza 10 %. Mizas paraugu smalcināšanu veica manuāli, izmantojot nažu tipa dzirnavas “Retsch SM-100”, tad sijāja caur 2 mm sietu. Sasmalcinātu mizas paraugu glabāja saldētavā -17 °C temperatūrā.

2.4. Mitruma un pelnu noteikšana

Mitruma noteikšana. Mitruma noteikšanai izmantoja mitruma analizatoru KERN MLB50-3, (2.1. attēlā). Nosvēra 0,5 - 1,0 g parauga, aiztaisīja analizatora vāku, žāvēja ar infrasarkanā starojumu 105 ± 2 °C temperatūrā līdz konstantai masai. Analīzes beigās parauga mitrums (W_r , %) bija redzams uz analizatora ekrāna. Katram paraugam mērījumus atkārtoja trīs reizes. Iegūtie rezultāti tika statistiski apstrādāti, izmantojot *Excel* funkcijas - *STDEV.S* Standartnovirzes (S_n) un *CONFIDENCE.T* drošības intervāla (DI) aprēķināšanai, un ir atspoguļoti 3.1. tabulā.



2.1.att. Mitruma analizators [25]

Pelnu noteikšana. Porcelāna tīģelīti kopā ar vāciņu izkarsēja stundu mufelkrāsnī 600 °C temperatūrā, tad tīģelīti atdzesēja eksikatorā un nosvēra uz analītiskajiem svāriem. Tīģelīti uz analītiskajiem svāriem iesvēra 1 – 2 g mizas. Tīģelīti novietoja uz elektriskās plītiņas, un tā saturu uzmanīgi, neļaujot paraugam uzliesmot, pārroģloja. Porcelāna tīģeli ar pārroģloto paraugu ievietoja mufelkrāsnī un karsēja vēl 3 – 4 stundas. Ja pelni nebija pilnībā balti, pievienoja pāris pilienus ūdeņraža peroksīda, samaisīja un lika karsēties vēl uz stundu. Beidzot karsēšanu, tīģelīti ievietoja eksikatorā un ļāva atdzist līdz istabas temperatūrai. To nosvēra uz analītiskajiem svāriem, un ievietoja atpakaļ mufelkrāsnī karsēties uz stundu. Šo etapu atkārtoja līdz tīģelīša un pelnu svārs kļuva nemainīgs. Iegūtie dati ir atspoguļoti 3.3. tabulā.

$$W_{(pelnu\ saturs)} = \frac{pelnu\ svārs}{sausā\ parauga\ iesvārs} \cdot 100\% \quad (2.1)$$

2.5. Priedes mizas ekstrakcija

Paātrināta šķīdinātāja ekstrakcija. Ekstrakcijas šūnā (66 mL) ievietoja celulozes filtru un nosvēra uz analītiskajiem svāriem. Šūnu papildīja ar analizējamo paraugu un šūnu nosvēra atkārtoti. Ekstrakcijas šūnu ievietoja paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas aparāta autosamplerā un veica ekstrakciju pēc izvēlētās programmas – istabas, 80, 90, 100, 120 °C temperatūrā, 1500 psi spiedienā, 5 min. 3 ciklus katram paraugam. Ekstrakcijas veicot tikai ar n – heksānu, ekstrakcija aizņēma aptuveni 30 minūtes, patērētais šķīdinātāja tilpums – līdz 200 mL, kopā ar skalošanu. Veicot secīgu ekstrakciju, paraugu ekstrahēja, sākot ar nepolārāko šķīdinātāju un tos atdestilēja, izmantojot rotācijas ietvaicētāju. Tālāk veica paraugu liofilizāciju sausa parauga iegūšanai. Paraugus glabāja saldētavā - 17 °C temperatūrā. Katru ekstrakciju veica trīs reizes.



2.2. att. Paātrināta šķīdinātāja ekstrakcijas iekārta ASE 350 Dionex

Macerācija. Uz analītiskajiem svāriem nosvēra aptuveni 25 g mizas, kvantitatīvi pārnesa 250 mL koniskajā kolbā, pievienoja 150 mL šķīdinātāja (60 % etanola vai n-heksāna) un atstāja uz noteiktu laiku – 1, 24, 72 stundām. Maisījumu filtrēja un mizai pievienoja jaunu šķīdinātāja porciju, atstāja uz iepriekš izvēlēto laiku. Šo procedūru ar katru paraugu atkārtoja 3 reizes. Paraugu ekstrahējot ar 60 % etanolu, šķīdinātāju nodestilēja, izmantojot rotācijas ietvaicētāju, un liofilizēja. Iegūtos ekstraktus glabāja ledusskapī +4 °C temperatūrā. Katru ekstrakciju paraugam atkārtoja 3 reizes.

Ekstrakcijas iznākumus aprēķināja pēc formulas:

$$m_{tīr.iesv.} = m_{mizai} - w_r - w_{pelni} \quad (2.2),$$

kur $m_{tīr.iesv.}$ – masa mizas iesvaram, bez mitruma un pelniem, g ;

m_{mizai} – mizas iesvara masa, g ;

w_r – mitruma saturs mizā, % ;

w_{pelni} – pelnu saturs mizā, %.

$$w_{ekstr.} = \frac{m_{ekstr.}}{m_{tīr.iesv.}} \cdot 100\% \quad (2.3),$$

kur $w_{ekstr.}$ – ekstrakta masas daļa, % ;

$m_{ekstr.}$ – mizas ekstrakta masa, g.

Ekstrakcija ar tetrafluoretānu (R134a). Uz analītiskajiem svāriem nosvēra ~ 75 (\pm 0,0001) g mizas, pārnesa filtrēšanas maisā (porainība 50 μ m). Filtrēšanas maisu ievietoja iekārtā ekstrakcijai ar sašķīdinātu gāzi (NECTACEL® 1, *Celsius*, Villette de Vienne, Francija) (skat. 2.3. attēlu). Ekstraktorā vakuimizēja un iepildīja sašķīdinātu R134a, 857 g. jeb 0,7 L , piefiksējot spiedienu reaktorā un termostatēja 30 °C temperatūrā, sekojot spiediena izmaiņām reaktorā. Ekstrakciju veica 1, 6 un 20 stundas pēc noteiktā spiediena sasniegšanas. Pēc izvēlētajā ekstrakcijas laika ekstraktu savāca kolbā. Iegūtos ekstraktus glabāja ledusskapī +4 °C temperatūrā. Katru ekstrakciju atkārtoja 3 reizes.



2.3. att. Iekārta ekstrakcijai ar sašķidrinātu gāzi NECTACEL® 1, Celsius

Macerācija paaugstinātā temperatūrā. Uz analītiskajiem svāriem nosvēra ~ 75 (\pm 0,0001) g mizas, ievietoja filtrēšanas maisā (porainība 50 μ m). Filtrēšanas maisu ievietoja iekārtā ekstrakcijai ar sašķidrinātu gāzi (NECTACEL® 1, Celsius, Villette de Vienne, Francija). Ekstraktorā iepildīja 0,7 L n-heksāna un termostatēja 30 °C temperatūrā 1, 6 un 20 stundas. Pēc izvēlētajā ekstrakcijas laika ekstraktu savāca kolbā, filtrēja. Iegūtos ekstraktus glabāja ledusskapī 4 °C temperatūrā. Katru ekstrakciju paraugam atkārtoja 3 reizes.

Ekstrakcija ar sauso ledu. Uz analītiskajiem svāriem nosvēra ~ 15 (\pm 0,0001) g mizas, pārnesa trīskaklu apaļkolbā. Sastādīja ekstrakcijas iekārtu, kuras shēma ir atspoguļota 1.13. attēlā. Kā šķīdinātāju izmantoja etanola:ūdens maisījumu (1:1), 10 mL. Šķīdinātāju ielēja miglas ģeneratora kolbā, kuru, savukārt, ievietoja ūdens vannā (30 °C). Ekstrakta savācējkolbai pieslēdza vakūumsūkni. Miglas ģeneratora kolbā ar 50 % etanola šķīdumu ievietoja ~ 5 sausā ledu gabalus. Tajā brīdī sāka ģenerēties augsta blīvuma mikropilienu migla, kura plūsma, pateicoties pazeminātam spiedienam, ātri nonāca līdz kolbai ar ekstrahējamo vielu. Mikropilieni kondensējās atceces dzesinātajā un nonāca ekstrakta savācējkolbā. Ekstrakciju veica 5 minūtes. Ekstrakciju atkārtoja 3 reizes.

2.6 Ekstraktu analīze

GH-MS analīze. Uz analītiskajiem svāriem hromatogrāfijas pudelītē nosvēra ~ 5,0 (\pm 0,1) mg parauga, izšķīdināja 1 mL šķīdinātāja (acetona vai heksānā). Analīzēm ņēma 2 μ L parauga. Kapilāra tipa kolonnā (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m) ar fāzi RTX-1701. Gāzes hromatogrāfijā (*Shimadzu* GC-MS-QP2010) nesējgāze ir hēlijs ar lineāro ātrumu kolonnā 20,0 cm s⁻¹. Hromatogrāfijas procesu veica režīmā - sākot no 40 °C 7,5 minūtes uztur dotu temperatūru nemainīgu, tad paaugstināja temperatūru ar ātrumu 3 °C min⁻¹ līdz tiek sasniegti 270 °C un 10 minūtes izturēja dotu temperatūru nemainīgu. Masas spektru uzņemšanai izmantoja elektrona trieciena jonizāciju (70 eV) un kvadrapola masas analizatoru ar skenēšanas apgabalu no 15,00 līdz 350,00 m/z. Produktu identifikācijas izmantoja *Shimadzu Corporation* (Japan) *Lab Solution* datu bāzi (GC-MS *solution Version* 2.40).

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Pētījuma sākumā kursa darba ietvaros tika pētīta ne tikai priedes, bet arī apses (*Populus tremula*) miza. Apses aptuvenais vecums bija 27 gadi, meža tips – vēris. Apses mizai tika noteikts mitruma un pelnu saturs, kā arī veiktas paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija un macerācija. Iegūtos datus skatīt 3.1. tabulā. Izvērtējot Valsts Meža dienesta rīcībā esošos datus par valdošām sugām Latvijas mežos, tika konstatēts, ka priedes miza ir daudz pieejamāks materiāls, nekā apses miza. Sakarā ar to tika pieņemts lēmums par pētījuma turpināšanu tikai ar priedes mizu, taču apses miza var tikt pētīta perspektīvā kā vērtīgs izejmateriāls dažādu savienojumu iegūšanai, sakarā ar to procentuāli lieliem ekstraktu iznākumiem.

3.1. tabula

Apses mizas ekstraktu iznākumi (%), izmantojot dažādas ekstrakcijas metodes

Analizējamais paraugs	Ekstrakcijas metode	Šķīdinātājs	Iznākums (%)	Kopā
<p>Apses miza</p> <p>Pelnu saturs: 4,8 ± 0,4 %</p> <p>Mitruma saturs: 8,75 ± 0,09 %</p>	ASE	Heksāns	5,1 ± 0,3	23,3 ± 1,4
		Etilacetāts	7,3 ± 0,5	
		60% Etanols	10,9 ± 0,7	
	ASE	Heksāns	5,0 ± 0,4	23 ± 2
		60% Etanols	18,2 ± 1,3	
	ASE	H ₂ O	15,63 ± 1,1	
Macerācija	60% Etanols	18 ± 2		

3.1. Mitruma un pelnu noteikšana

Izmantojot mitruma analizatoru, tika noteikti parauga mitrumi. Iegūtie dati tika statistiski apstrādāti ar *Excel* programmu. Analizētām priedes mizām (dažāda augstuma no zemes), mitruma rādītāji atšķiras. Mitrums priedes mizai līdz 4 metriem no zemes ir lielāks, nekā mizai virs 4 metriem no zemes, attiecīgi 10,23 ± 0,12 % un 9,36 ± 0,07 %. Iegūtie rezultāti ir apkopoti 3.2. tabulā.

Mitruma saturs (W_r) analizējamajos paraugos ar standartnovirzi (S_n) un drošības intervālu (DI)

Paraugs	W_r, % (1)	W_r, % (2)	W_r, % (3)	W_r, % (vid)	S_n, %	DI, %
Priedes miza (līdz 4 metriem no zemes)	10,19	10,28	10,21	10,23	0,05	0,12
Priedes miza (virs 4 metriem no zemes)	9,33	9,39	9,36	9,36	0,03	0,07

Veicot pelnu noteikšanu priedes mizai līdz 4 metriem un virs 4 metriem, tika noteikts, ka pelnu saturs ir lielāks paraugam, kas ir ņemts virs 4 metru augstuma. Iegūtos rezultātus skatīt 3.3. tabulā. Literatūras avotā [78] ir pieejami dati, ka pelnu saturs priedes mizā ir 2,6 %, taču priedes vecums un augstums nav zināms. Ņemot vērā, ka pētījumā tika noteikts pelnu saturs diviem priedes mizas paraugiem ar dažādu augstumu no zemes, un zinot, ka pelnu saturs ir atkarīgs no daudziem parametriem un katram kokam tas ir atšķirīgs, var secināt, ka iegūtie dati ir ticami.

Pelnu noteikšanas rezultāti

Paraugs	Pelnu saturs, %
Priedes miza (līdz 4 metriem no zemes)	1,4 ± 0,2
Priedes miza (virs 4 metriem no zemes)	2,4 ± 0,2

3.2. Ekstrakcijas produktu iznākumi

Izmantojot ASE secīgu ekstrakciju sākot ar nepolārāko šķīdinātāju, priedes mizas (augstumā līdz 4 metriem no zemes) lielākais ekstraktu iznākums ir izmantojot kā šķīdinātāju 60% etanolu ($10,2 \pm 0,8$ %), savukārt mazākais ekstraktu iznākums ir izmantojot kā šķīdinātāju etilacetātu (tikai $1,50 \pm 0,11$ %). Kopējais ekstraktu iznākums sasniedz $14,7 \pm 1,1$ % no mizas iesvara (ņemot vērā mitruma un pelnu saturu šim un visiem pārējiem iesvariem).

Ekstrahējot priedes mizu augstumā līdz 4 metriem no zemes, n-heksāna ekstraktu iznākumi abos gadījumos ir rezultātu drošības intervāla robežās.

Izmantojot secīgu ekstrakciju ar diviem šķīdinātājiem, etanola ekstrakta iznākums sastāda $12,0 \pm 0,8$ %, kas ir nedaudz lielāks par etanola ekstraktu, izmantojot secīgu ekstrakciju ar 3 šķīdinātājiem. Kopējie ekstraktu iznākumi, izmantojot secīgu ekstrakciju ar 2 un 3 šķīdinātājiem ir līdzīgi.

Iegūstot ekstraktus ar ūdeni kā šķīdinātāju paātrinātā šķīdinātāju ekstrakcijā, to iznākums sasniedz tikai $9,0 \pm 0,9$ %, kas ir ievērojami mazāk, salīdzinot ar iepriekš izmantotiem šķīdinātājiem.

Ekstrahējot priedes mizu (līdz 4 m no zemes) ar macerācijas metodi, kā šķīdinātāju izmantojot 60% etanolu, ekstrakta iznākums sastādīja $12,9 \pm 1,2$ %. Macerācija, salīdzinot ar ASE, ir daudz laukietilpīgāka metode, kā arī patērēta šķīdinātāja tilpums ir ievērojami lielāks. Iegūtie rezultāti ir apkopoti 3.4. tabulā.

3.4. tabula

Priedes mizas augstumā līdz 4 metriem no zemes ekstraktu iznākumi (%), izmantojot dažādas ekstrakcijas metodes

Analizējamais paraugs	Ekstrakcijas metode	Šķīdinātājs	Iznākums (%)	Kopā (%)
Priedes miza	ASE	Heksāns	$3,0 \pm 0,2$	$14,7 \pm 1,1$
		Etilacetāts	$1,50 \pm 0,11$	
		60% Etanols	$10,2 \pm 0,8$	
Pelnu saturs: $1,4 \pm 0,2$ %	ASE	Heksāns	$3,1 \pm 0,2$	$15,1 \pm 1,2$
		60% Etanols	$12,0 \pm 0,8$	
Mitruma saturs: $10,23 \pm 0,12$ %	ASE	H ₂ O	$9,0 \pm 0,9$	
	Macerācija	60% Etanols	$12,9 \pm 1,2$	

Izmantojot paātrinātu šķīdinātāju secīgu ekstrakciju ar trim šķīdinātājiem priedes mizas (augstumā virs 4 metriem no zemes) vislielākais iznākums ir etanola ekstraktam – $24,4 \pm 1,4$ %. Vismazākais iznākums ir etilacetāta ekstraktam. Kopējais ekstraktu iznākums sasniedz 31 ± 2 %.

Priedes mizas (augstumā virs 4 m no zemes) ekstraktu kopējais iznākums, izmantojot ASE ar diviem šķīdinātājiem - heksānu un 60% etanolu, ir 28 ± 2 %, kas ir par 3 % mazāk, secīgi ekstrahējot analizējamo paraugu ar trim šķīdinātājiem.

Priedes mizas augstumā virs 4 metriem no zemes ASE ūdens ekstrakta iznākums sastāda $20,4 \pm 1,4$ %, kas ir vismazākais iznākums no visām četrām izvēlētām ekstrakcijas metodēm.

Izmantojot macerācijas metodi ar 60 % etanolu kā šķīdinātāju priedes mizai virs 4 metriem no zemes, ekstrakcijas iznākums sastāda 25 ± 3 %. Šī ekstrakcijas metode ir neefektīvāka, salīdzinot par ASE, izmantojot trīs un divus šķīdinātājus. Iegūto ekstraktu iznākumi ir attēloti 3.5. tabulā.

3.5. tabula

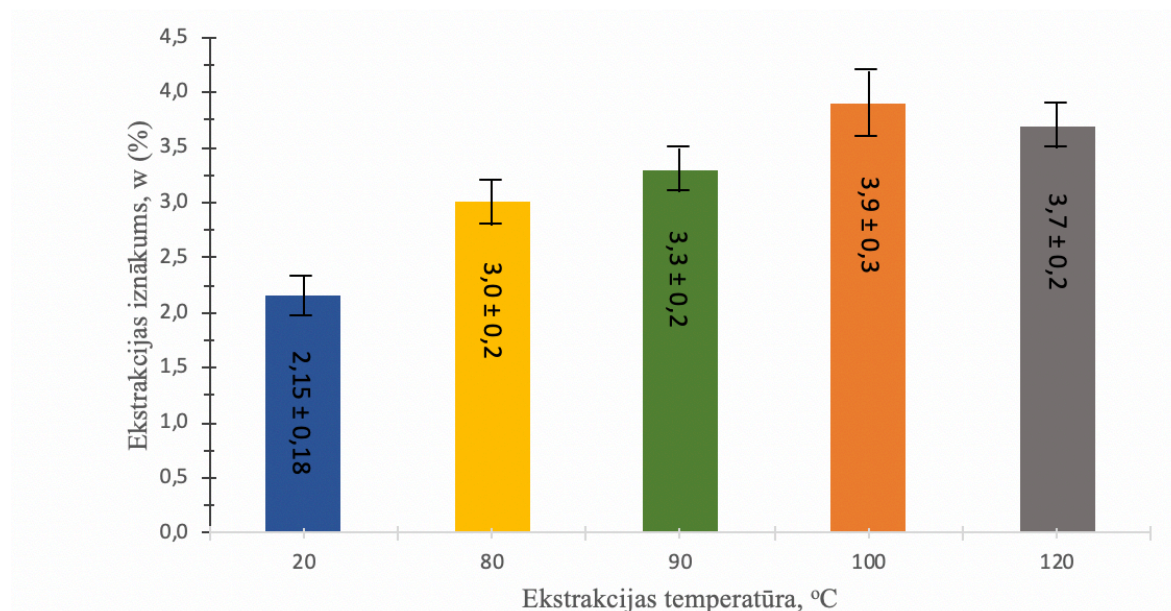
Priedes mizas augstumā virs 4 metriem no zemes ekstraktu iznākumi (%), izmantojot dažādas ekstrakcijas metodes

Analizējamais paraugs	Ekstrakcijas metode	Šķīdinātājs	Iznākums (%)	Kopā (%)
Priedes miza	ASE	Heksāns	$3,9 \pm 0,3$	31 ± 2
		Etilacetāts	$2,4 \pm 0,2$	
		60% Etanols	$24,4 \pm 1,4$	
Pelnu saturs: $2,4 \pm 0,2$ %	ASE	Heksāns	$4,0 \pm 0,3$	28 ± 2
Mitruma saturs: $9,36 \pm 0,07$ %		60% Etanols	$24,1 \pm 1,7$	
	ASE	H ₂ O	$20,4 \pm 1,4$	
	Macerācija	60% Etanols	25 ± 3	

Izvērtējot iegūtos rezultātus, tika konstatēts, ka lielāks ekstraktu iznākums ir priedes mizas paraugam augstumā virs 4 metriem no zemes. Sakarā ar to, tika pieņemts lēmums pētījumu turpināt tikai ar vienu paraugu – priedes mizu augstumā līdz 4 metriem no zemes, lai iegūtu reprezentatīvus rezultātus.

Ekstrahējot priedes mizu augstumā līdz 4 metriem no zemes ar ASE dažādās temperatūrās, kā šķīdinātāju izmantoja n–heksānu. Iegūtie rezultāti ir atspoguļoti 3.1. attēlā. Novēro, ka ekstrakciju veicot istabas temperatūrā, ekstraktu iznākums ir vismazākais. Temperatūrai paaugstinoties, palielinās ekstraktu iznākums, taču 120 °C temperatūrā ekstraktu iznākums nedaudz samazinājās. Tas var būt skaidrojams ar to, ka augstākās temperatūrās, ap 120 °C, sākas savienojumu termiskā degradācija. Spriežot pēc iegūtiem datiem, ASE 100 °C temperatūrā ar n–heksānu ir efektīvāka, salīdzinot ar ekstrakciju citās temperatūrās.

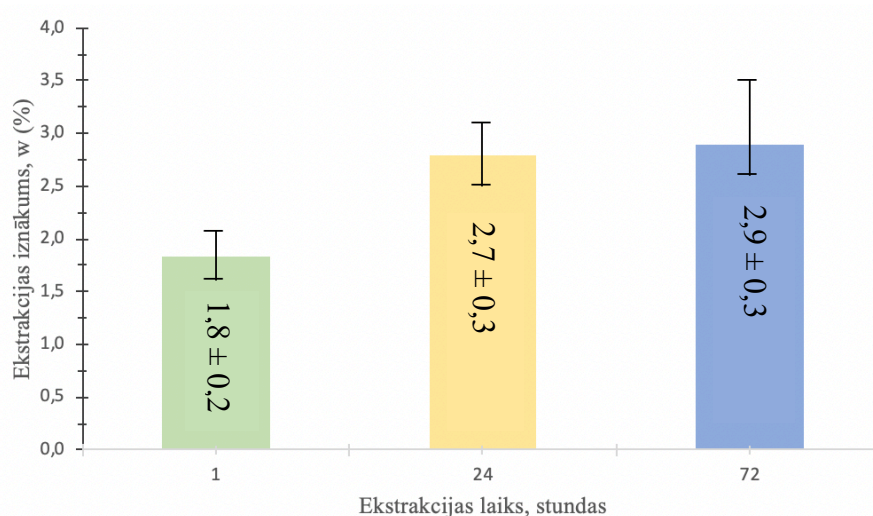
Saskaņā ar literatūru [79] tāda tendence tika novērota arī egles mizai (*Picea abies*). Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakciju ar n-heksānu veicot trīs dažādās temperatūrās – 80, 100 un 120 °C, lielākais ekstrakta iznākums tika iegūts 100 °C temperatūrā, taču 120 °C temperatūrā ekstrakta iznākums samazinājās.



3.1.att. Ekstrakcijas (ASE) rezultāti ar n-heksānu priedes mizai dažādās temperatūrās

Macerācija (šķīdinātājs – n-heksāns) istabas temperatūrā priedes mizai tika veikta 1; 24 un 72 stundu garumā. Ekstrakcijas laikam palielinoties, palielinās arī ekstrakta iznākums. Straujš ekstrakta iznākumu pieaugums ir salīdzinot macerāciju 1 un 24 stundu garumā, savukārt macerācijas 72 stundu garumā rezultāti krietni neatšķiras no 24 stundu ilgas ekstrakcijas. Spriežot pēc iegūtiem datiem, 72 stundu ilga ekstrakcija nav tik efektīva, kā macerācija 24 stundu garumā, sakarā ar to, ka ekstrakcijas ilgums ir 3 reizes ilgāks, bet rezultāts ir līdzvērtīgs.

Ņemot vērā, ka kopējais ekstrakcijas laiks ASE 3 cikliem noteiktā temperatūrā ir līdz 30 minūtēm un kopējais šķīdinātāja patērētais tilpums ir līdz 200 mL, savukārt macerācijas 3 cikli (istabas temperatūrā) aizņem 3 x 1 stunda, 3 x 24 stundas vai 3 x 72 stundas, ar patērēto šķīdinātāja tilpumu 3 x 150 mL, un macerācijas ekstrakta iznākumi ir līdzīgi vai pat mazāki, var secināt, ka macerācija ar n-heksānu priedes mizai lipofīlo savienojumu iegūšanai nav tik efektīva metode.



3.2.att. Macerācijas rezultāti ar n-heksānu priedes mizai pēc dažāda ekstrakcijas ilguma

Ekstrakcija ar sašķidrinātu gāzi – freonu R134a tika veikta 1; 6 un 20 stundu garumā. Macerācijas ar heksānu paaugstinātā temperatūrā (30 °C) rezultāti tika savstarpēji salīdzināti ar R134a ekstrakcijas rezultātiem.

Atšifrējumi:

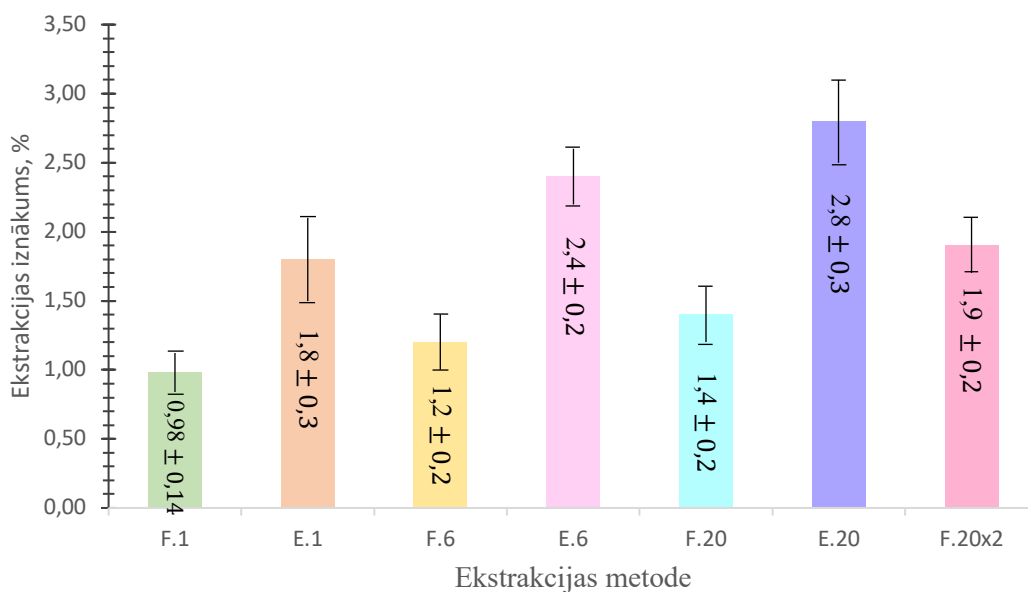
- F.1 – ekstrakcija ar R134a. 1 stunda, 30 °C;
- F.6 – ekstrakcija ar R134a. 6 stundas, 30 °C;
- F.20 – ekstrakcija ar R134a. 20 stundas, 30 °C;
- F.20x2 – ekstrakcija ar R134a. 2 cikli, katrs 20 stundas, 30 °C;
- E.1 – macerācija ar n-heksānu. 1 stunda, 30 °C;
- E.6 – macerācija ar n-heksānu. 6 stundas, 30 °C;
- E.20 – macerācija ar n-heksānu, 20 stundas, 30 °C.

Pēc 3.3. attēlā atspoguļotiem datiem var redzēt, ka ekstrakcijas laikam palielinoties, ekstraktu iznākumi palielinās gan macerācijas ar heksānu, gan R134a ekstrakcijas gadījumā.

Novēro, ka R134a lipofīlo ekstraktu iznākumi ir salīdzinoši mazi, salīdzinot ar citām izmantotām ekstrakcijas metodēm. Taču jāņem vērā, ka iegūtais rezultāts ir pēc viena cikla ekstrakcijas. Tā kā ekstrakcija ar freoniem šobrīd ir tikai izstrādes stadijā, tika pieņemts lēmums 2. ekstrakcijas ciklu veikt F.20. paraugam, kuram tika iegūts vislielākais ekstraktu iznākums (salīdzinot ar F.1. un F.6). Pēc 2. cikla ekstraktu iznākums palielinājās par ~ 35 %. Perspektīvā tiks veikta 3. ciklu ekstrakcija katram paraugam, jo iegūtie dati pierādīja ekstrakcijas ciklu efektivitāti.

Iespējams, pielāgojot ekstrakcijas parametrus ir iespējams iegūt lielākus ekstraktu iznākumus. Tā kā freoniem kā šķīdinātājiem ir liela perspektīva šķīdinātāju lomā, īpaši kā

alternatīva n-heksānam, pētījumu ir nepieciešams turpināt, lai gūtu pietiekami daudz informācijas par šīs ekstrakcijas metodes efektivitāti.



3.3.att. Sašķidrināta R134a un macerācijas ekstrakciju rezultāti 30 °C temperatūrā

Salīdzinot macerāciju istabas temperatūrā un 30 °C temperatūrā, ir redzams, ka rezultāti ir līdzīgi. Tas varētu būt skaidrojams ar to, ka 30 °C ir nepietiekama temperatūra ekstraktu iznākumu palielināšanai, izmantojot macerācijas metodi.

Ekstrahējot priedes mizu ar ASE istabas temperatūrā, n-heksāna ekstrakta iznākums $2,15 \pm 0,18$ %, savukārt 1 stundas ilgas 3 ciklu macerācijas n-heksāna ekstrakta iznākums istabas temperatūrā ir $1,8 \pm 0,2$ %. Iegūtie dati liecina par to, ka ASE ir efektīvāka ekstrakcijas metode, taču iznākumu starpība nav tik liela, lai atzītu macerāciju par neefektīvu ekstrakcijas metodi lipofīlu savienojumu iegūšanai.

3.3. Parauga analīze

Rezultātu savstarpējai salīdzināšanai tika izvēlēti biežāk sastopami savienojumi analizētajos paraugos. Iegūtos rezultātus skatīt 3.6. tabulā. Visi analizētie ekstrakti satur α -pinēnu, lielākā daļa ekstraktu satur β -pinēnu un D-limonēnu, kas ir ļoti vērtīgi savienojumi.

Atšifrējumi:

M.1 – macerācija ar n-heksānu. 1 stunda x 3 cikli, istabas temperatūra;

M.24 – macerācija ar n-heksānu. 24 stundas x 3 cikli, istabas temperatūra;

M.72 – macerācija ar n-heksānu. 72 stundas x 3 cikli, istabas temperatūra;

- A.I – ASE ar n–heksānu. Istabas temperatūra;
 A.80 – ASE ar n–heksānu. 80 °C temperatūra;
 A.90 – ASE ar n–heksānu. 90 °C temperatūra;
 A.100 – ASE ar n–heksānu. 100 °C temperatūra;
 A.120 – ASE ar n–heksānu. 120 °C temperatūra.

3.6. tabula

Priedes mizas ekstraktvielās identificētie savienojumi

	F.1	F.6	F.20	E.1	E.6.	E.20	M.1	M.24	M.72	A.I	A.80	A.90	A.100	A.120
α -pinēns	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -pinēns	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D-limonēns	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Pentadekāns	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Eikozāns	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Elaidīnskābe	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Oleīnskābe	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

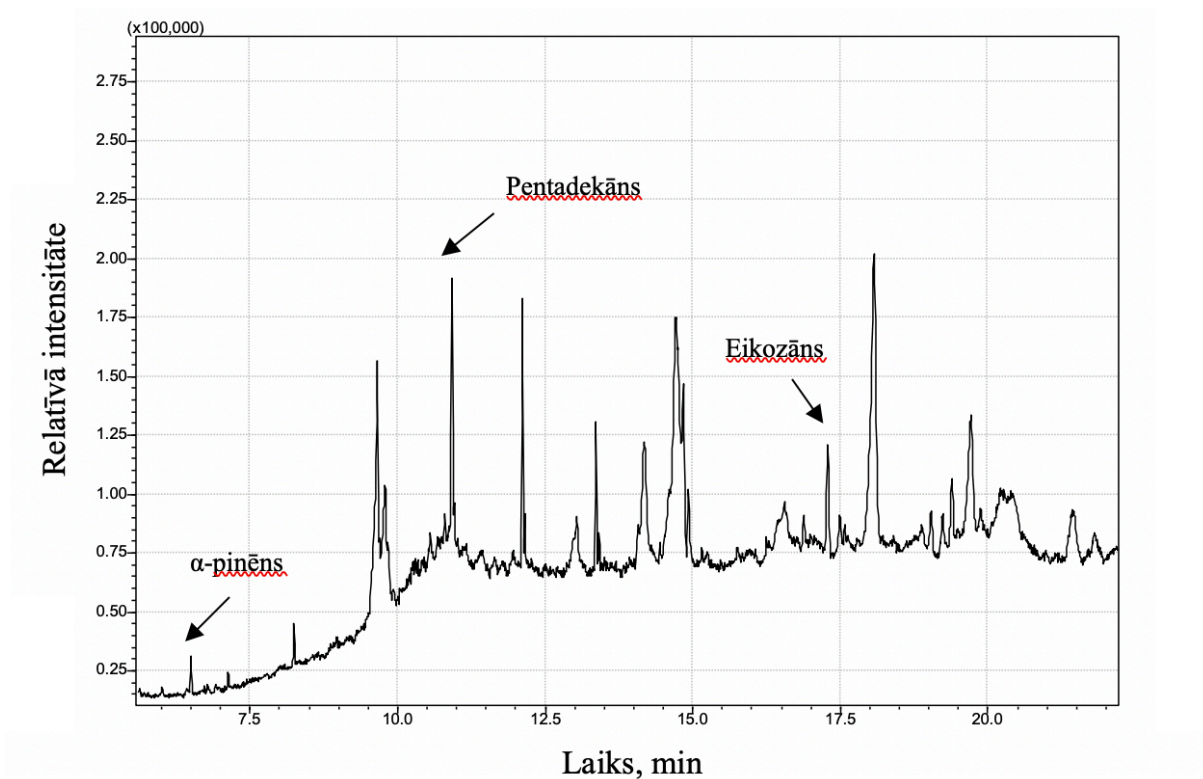
Ķīmiskā sastāva kompozīcija F. sērijas paraugiem ir vislielākā no analizētajām – F.1., F.6. un F.20. ekstraktos ir noteikti ~ 50 savienojumu, taču 20 no tiem nav identificēti. Vērtīgu savienojumu saturs F. sērijas ekstraktos ir: α -pinēns sastāda 0,75 – 2,71 %, β -pinēns 0,65 – 0,91 %, D-limonēns 0,15 – 0,28 %, oleīnskābe 3,93 – 11,40 %.

E. sērijas ekstraktiem ķīmiskā sastāva kompozīcija ir daudz nabadzīgāka – kopā ir noteikti 22 savienojumi, 11 no kuriem nav identificēti. α -pinēna saturs analizētajos ekstraktos sastāda 6,51 – 7,68 %, β -pinēns 1,50 – 3,70 %, D-limonēns 0,24 – 0,79 %, savukārt oleīnskābe nav identificēta.

M. sērijas ekstraktiem kopā ir noteikti līdz 34 savienojumiem, no kuriem nav identificēti 6 – 12 savienojumi. α -pinēna saturs analizētajos ekstraktos sastāda 0,25 – 1,54 %, β -pinēns 0,71 – 4,31 %, D-limonēns 0,24 – 0,79 %. Oleīnskābe šajā paraugu sērijā netika identificēta.

Ķīmiskā sastāva daudzveidība A. sērijas paraugiem ir nedaudz lielāka par E. sērijas paraugiem – kopā ir noteikti ~ 30 savienojumi, no kuriem nav identificēti līdz 10 savienojumu. α -pinēns sastāda 0,69 – 5,97 % no ekstrakta masas. β -pinēns (2,92 %) un D-limonēns (0,34 %) ir noteikti tikai A.I. ekstraktā, taču oleīnskābe nav noteikta nevienā paraugā.

Pēc hromatogrammas bildes (skatīt 3.4. att.), var redzēt, ka tikai dažas smailes ir skaidri redzamas, taču daudzas netiek identificētas. Ir nepieciešams veikt uzlabojumus lipofilu savienojumu analīzei precīzāku rezultātu iegūšanai.



3.4. att. Priedes mizas ASE n-heksāna ekstraktu hromatogramma 100 °C temperatūrā

SECINĀJUMI

1. Iegūtie rezultāti parādīja, ka lipofīlos savienojumus no Latvijā augošu priedes mizām ir iespējams iegūt ar alternatīvām (sašķidrinātās gāzes) ekstrakcijas metodēm ar pietiekoši labu iznākumu, attiecīgi ar n-heksānu 2,8 % no mizas masas, savukārt 1,9 % izmantojot freonu R134a.
2. Izmantojot modernās ekstrakcijas metodes (ASE) ir noteikts, ka pārāk liela temperatūra virs 100 °C samazina lipofīlo ekstraktvielu iznākumu, kas ir izskaidrojams ar šo savienojumu degradāciju.
3. Iegūtie dati parādīja, ka iegūtām lipofīlām ekstraktvielām ar freonu R134a ir lielāka ķīmiskā kompozīcija, kā oleīnskābe freona R134a ekstraktā sastāda līdz 11,40 % savukārt ar n-heksānu iegūtā ekstraktā tā nav identificēta.
4. Ir parādīta freona R134a potenciālā izmantošana lipofīlu savienojumu iegūšanai no Latvijā augošas priedes mizas, lai aizstātu tādus toksiskus šķīdinātājus kā n-heksāns.
5. Ir nepieciešams turpināt iesāktos eksperimentus ar sašķidrinātām gāzēm, jo eksperimenti ir tikai pētījumu sākuma procesā.

PATEICĪBAS

Autore izsaka pateicību darba vadītājiem – Mārim Laubertam un Arturam Vīksnam par sniegto palīdzību darba izstrādē, kā arī lignīna ķīmijas laboratorijas kolektīvam par atsaucību un palīdzību.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. ES statistikas biroja „Eurostat”. <http://europa.eu> (skatīts 14.02. 2019)
2. Valsts Meža dienesta Zemkopības ministrijas nozares portāls. <http://www.vmd.gov.lv> (skatīts 14.02.2019)
3. Mátyás, C.; Ackzell, I.; Samuel, C.J.A. *Pinus sylvestris - Technical guidelines for genetic conservation and use for Scots pine*, **2003**, 2 - 4.
4. Ruane, J., Sonnino, A., Agostini, A. *Bioenergy and the potential contribution of agricultural biotechnologies in developing countries. Biomass Bioenergy* **2010**, 34, 1428 – 1439.
5. Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N., *Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics* **2007** 108, 69 – 93.
6. Silvestre, A.J.D.; Gandini, A. *Rosin: Major Sources, Properties and Applications. In Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*; Belgacem, M.N., Gandini, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; pp. 67 – 88.
7. Haibo Xie, Nicholas Gathergood, *The Role of Green Chemistry in Biomass Processing and Conversion* **2013**, 10 - 18.
8. Nascimento M. S., Santana A. L., Maranhao C.A., Oliveira L.S., Bieber L., *Phenolic Extractives and Natural Resistance of Wood* **2013**, 350 – 364.
9. Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T. *The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. Science* **2006**, 311, 484 - 489.
10. Bioenergy Consult Home Page. <https://www.bioenergyconsult.com/tag/types-of-biomass> (skatīts 01.11.2018.).
11. Lucas, M., Macdonald, B.A., Wagner, G.L., Joyce, S.A., Rector, K.D. *Ionic Liquid Pretreatment of Poplar Wood at Room Temperature: Swelling and Incorporation of Nanoparticles. ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, 2 (8), 2198 - 2205.
12. Hu, G., Heitmann, J., Rojas, O. *Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. BioResources* **2008**, 3, 270 - 291.
13. G. Zaķis, *Koksnes Ķīmijas Pamati* **2005**, 21- 35.
14. Furkan H., Remzi C., *Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Polymers* **2016**, 4 -11.

15. Pratima Bajpai, *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production* **2016**, 7 - 20.
16. Roger C. Pettersen, *The Chemical Composition of Wood* **1984**, 62 - 75.
17. Yang, G., Jaakkola, P. *Wood chemistry and isolation of extractives from wood*. Literature study for BIOTULI project, Saimaa University of Applied Sciences **2011**, 1 – 28.
18. Clark, J.H.; Deswarte, F.E.I. *The Biorefinery Concept—An Integrated Approach*. In *Introduction to Chemicals from Biomass*; Clark, J., Deswarte, F., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NK, USA, **2008**; pp. 1 – 20
19. Eeri Sjostrom, *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*, Second Edition, **1992**, 73 - 105.
20. Gellerstedt, G., Önnerrund, H. *Inhomogeneities in the chemical structure of hardwood lignins*. *Holzforschung* **2003**, 57, 257 - 264.
21. Gärtner, A., Gellerstedt, G., Tamminen, T. *Determination of phenolic hydroxyl groups in residual lignin using a modified UV - method*. *J. Nord. Pulp Pap. Res.* **1999**, 14, 165 - 170.
22. Lignoworks Home Page. <http://www.icfar.ca/lignoworks/content/what-lignin.html> (skatīts 13.11.2018)
23. Silava, *Vadlīnijas Koksnes Pelnu Apstrādei un Izmantošanai Mežsaimniecībā*, **2016**, 8 - 16.
24. Anne Straumfors, Raymond Olsen, Hanne Line Daae, Anani Afanou, Dave McLean, Marine Corbin, Andrea Mannetje, Bente Ulvestad, Berit Bakke, Helle Laier Johansen, *Exposure to Wood Dust, Microbial Components, and Terpenes in Norwegian Sawmill Industry* **2018**, 673 - 676.
25. Sigma – Aldrich Home Page. <https://www.sigmaaldrich.com> (skatīts 20.02.2019)
26. Journal of Experimental Biology. <http://jeb.biologists.org> (skatīts 20.02.2019)
27. Rosaria Ciriminna, Monica Lomeli – Rodriguez, Piera Demma Cara, Jose A. Lopez – Sanchez, Mario Pagliaro. *Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy*, **2014**, 7 – 9.
28. Serban C. Moldoveanu. *Pyrolysis of Organic Molecules*, **2019**, 2, 72.
29. Мелентьева Г.А., *Фармацевтическая химия* **1985**, 286.
30. Lin, S.; Zhang, Y.; Liu, M.; Yang, S.; Gan, M.; Zi, J.; Song, W.; Fan, X.; Wang, S.; Liu, Y.; et al. *Abietane and C20-Norabietane Diterpenes from the Stem Bark of Fraxinus sieboldiana and Their Biological Activities*. *J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 1914 –1921
31. James J.T., Dubery I.A. *Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, Centella asiatica Urban*, *Molecules*, 14, **2009**, 3922 - 3942.
32. Gunstone F. *Fatty acid and lipid chemistry*. Chapman & Hall, Glasgow, **1996**, 2 – 17.

33. Thelen J.J., Ohlrogge J.B. *Meatabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. Metabolic Engineering* **2002**, 4, 12 - 19.
34. Bennet H. *Commercial waxes – natural and synthetic*. Chemical publishing CO, Brooklyn, **1944**, 7 - 84.
35. Rehm H., Hammar F. *Biochemie light*, Harri Deutsch, **2008**, 4 - 6.
36. Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. *The influence of natural products upon drug discovery*. Nat Prod Rep. **2000**, 17, 215 - 234.
37. Giacobbo, A., Oliveira, M., Mira, H., Duarte, E., Bernardes, A.M., de Pinho, M. *Ultrafiltration based process for the recovery of polysaccharides and phenolic compounds from winery effluents*. Sep. Sci. Technol. **2013**, 48, 438 - 444.
38. Puzstai, R., Abrantes, M., Sherly, J., Duarte, N., Molnar, J., Ferreira, M.J.U. *Antitumor-promoting activity of lignans: Inhibition of human cytomegalovirus IE gene expression*. Anticancer Res. **2010**, 30, 451 - 454.
39. Elinav, E., Nowarski, R., Thaïss, C.A., Hu, B., Jin, C., Flavell, R.A. *Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms*. Nat. Rev. Cancer **2013**, 13, 759 - 771.
40. Medola, J.F., Cintra, V.P., Pesqueira e Silva, É.P.C., de Andrade Royo, V., da Silva, R., Saraiva, J., Albuquerque, S., Bastos, J.K., Silva, M.L., Tavares, D.C. *(-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats*. Food Chem. Toxicol. **2007**, 45, 638 - 642.
41. Rossi, D., Guerrini, A., Bruni, R., Brognara, E., Borgatti, M., Gambari, R., Maietti, S., Sacchetti, G. *Trans-Resveratrol in nutraceuticals: issues in retail quality and effectiveness*. *Molecules* **2012**, 17 (10), 12393 - 12405.
42. Jančinová, V., Perečko, T., Nosál, R., Harmatha, J., Smidrkal, J., Drábiková, K. *The natural stilbenoid pinosylvin and activated neutrophils: effects on oxidative burst, protein kinase C, apoptosis and efficiency in adjuvant arthritis*. Acta Pharmacol Sin. **2012**, 33 (10), 1285 - 92.
43. Praveen Kumar Ashok, Kumud Upadhyaya. *Journal of Phramacognosy and Phytochemistry. Tannins are Astringent*, **3**, 45 – 49.
44. Charles Buck, Kenneth Vall. *Pharmacology. A Hanbook for Complementary Healthcare Professionals. Phenols*, **2009**, 21, 150 – 163.
45. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysgu A.L. *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. Angewandte Chemie International Edition, **2011**, 50 (3), 555 - 778.

46. Kashiwada, Y., Nonaka, G.I., Nishioka, I., Ballas, L.M., Jiang, J.B., Janzen, W.P., Lee, K.H. *Tannins as selective inhibitors of protein kinase C*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, 2, (3), 237 - 242.
47. Dixon, R & Pasinetti. *Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience*, **2010**, 452–457.
48. Kumar, S & Pandey, AK. *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*, **2013**
49. Оболенская А.В.; Щеголев В.П.; Аким Г.Л.; Косович Н.Л.; Емелянова И.З. *Практические работы по химии древесины и целлюлоз. Лесная промышленность: Москва*, **1965**, 49 – 56.
50. Akil Ahmad, Siti Hamidah Mohd – Setapar, Asma Khatoon, Muhammad Abbas Ahmad Zaini, Mohd Azizi Che Yunus. *Use of Supercritical CO₂ and R134a as Solvent for Extraction of β -Carotene and α -Tocopherols from Crude Palm Oil: A Review*, **2014**, 1 – 5.
51. Plaza, M., Turner, C. *Pressurized hot water extraction of bioactives. Trends in Analytical Chemistry* **2015**, 71, 39 – 54.
52. Bañez, E., Herrero, M., Mendiola, J.A., Castro-Puyana, M. *Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: Hayes, M. (Ed.), Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*, **2012**, 55 - 98.
53. Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J-Ho. *Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2017**, 16, 295 - 315.
54. Т. Ширшова. *Экстракция как метод выделения биологически активных соединений: краткий обзор*, **2002**.
55. Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International centre for science and high technology*, **2008**, 19 - 25.
56. Nur Atiquah Mohd Shamsuddin, Yusup Suzana, Wan Asma Ibrahim, Awais Bokhari, Lai Fatt Chuah. *Oil extraction from *Calophyllum inophyllum* L. via Soxhlet extraction optimization using response surface methodology (RSM)*, **2015**, 2 – 4.
57. П. Г. Думитраш, М. К. Болога, Т. Д. Шемякова. *Ультразвуковая экстракция биологически активных соединений из семян томатов*, **2016**, 47 – 51.
58. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. *Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. Pharmacognosy Reviews* **2007**, 1 (1), 10 - 14.

59. Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H. *Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules* **2013**, 18, 2347 - 2354.
60. V. Lopez-Avila, M.D. Luque de Castro. *Extraction. Microwave – Assisted extraction*, **2000**, 1390 – 1395.
61. Zhanga, H.F., Yangb, X.H., Wangc, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, **2011**, 22, 680 - 684.
62. Milestone SRL Home Page. <https://www.milestonesrl.com> (skatīts 15.04.2019)
63. Ju, Z.Y., Howard, L.R. *Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin*. **2003**, 51, 5206 – 5211.
64. Bruce Edward Ritchter, B.A. Jones, J. L. Ezzell, N.L. Porter, Nebojsa Avalovic, Chris Pohl. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, **1996**, 68 (6): 1033 – 1039.
65. И. Н. Зилфикаров, В. А. Челомбитько, А. М. Алиев. *Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами*, **2007**, 15 – 34.
66. L.A. Johnson, E.W. *Lusas Comparison of alternative solvents for oils extraction Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60 (**1983**), pp. 231 - 240.
67. Vincent Rapinel, Natacha Rombaut, Njara Rakotomanomana, Alain Vallageas, Giancarlo Cravotto, Farid Chemat. An original approach for lipophilic natural products extraction: Use of liquefied n – butane as alternative solvent to n – hexane. *LWT – Food Science and Technology Journal*, **2017**, 85, 524 – 533.
68. Ciro Aprea, A. Greco, Angelo Mairorino, Claudia Masselli, Antonio Metallo. *HFO1234ze as Drop-in Replacement for R134a in Domestic Refrigerators: An Environmental Impact Analysis*, **2016**, 965 – 970.
69. Vincent Rapinel, Cassandra Breil, Caroline Makerri, Magali Jacotet – Navarro, Njara Rakotomanomana, Alain Vallageas, Farid Chemat. Feasibility of using liquefied gas HFO-1234ze (trans-1,3,3,3-tetrafluoroprop-1-ene) as an alternative to conventional solvents for solid–liquid extraction of food ingredients and natural products. *LWT – Food Science and Technology*, **2017**, 83, 227 – 234.
70. T. Baysal, S. Ersus, D.A.J. Starmans Supercritical CO₂ extraction of β-carotene and lycopene from tomato paste waste, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 5509 – 5511.

71. R.M. Couto, P.C. Simões, A. Reis, T.L. Da Silva, V.H. Martins, Y. Sánchez-Vicente *Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodium cohnii** *Engineering in Life Sciences*, **2010**, *10*, 160 – 164.
72. Akil Ahmad, Siti Hamidah Mohd – Setapar, Asma Khatoon, Muhammad Abbas Zaini. Use of Supercritical CO₂ and R134a as Solvent for Extraction of b-Carotene and a-Tocopherols from Crude Palm Oil: A Review. *Asian Journal of Chemistry*, **2014**, *26 (18)*, 5912 – 5915.
73. A. N. Mustapa, Z. A. Manan, C. Y. Mohd Azizi, N. A. Nik Norulaini, A. K. Mohd Omar. Effects of parameters on yield for sub-critical R134a extraction of palm oil. *Journal of Food Engineering*, **2009**, *95 (4)*, 610 – 616.
74. Manfred Schwanninger, Barbara Hinterstoisser. *Comparison of the classical wood extraction method using a Soxhlet apparatus with an advanced extraction method*, **2002**, 1 – 5.
75. Dandan Han and Kyung Ho Row. Recent applications of ionic liquids in separation technology. *Molecules*, **2010**, *15*, 2406 – 2420.
76. Hui – Hsein Yand, Pawel L. Urban. *Dry ice fog extraction of volatile organic compounds*, **2018**, 2 – 7.
77. Anna Lytovchenko, Romina Beleggia, Nicolas Schauer, Tal Isaacson, Jan E Leuendorf, Hajno Hellmann, Jocelyn KC Rose, Alisdar R Fernie. *Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues*, **2008**, 3 – 7.
78. Лендъел П., Морваи Ш. *Химия и технология целюлозного производства. Лесная промышленность*, **1978**, 544.
79. Ales Haz, Petra Strižincova, Michal Jablonsky, Zuzana Burcova, Frantisek Kreps, Igor Surina, Alexandra Sladkova. *Comparison of accelerated solvent extraction and supercritical fluids extraction of spruce bark*, 2016, 1 – 4.

Bakalaura darbs „Nepolāru šķīdinātāju izmantošana priedes mizai lipofilu ekstraktu iegūšanai” izstrādāts LVKĶI Lignīna ķīmijas laboratorijā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: _____ Alise Girdjuka
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai:

Vadītājs profesors, Dr.chem. Arturs Vīksna: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Vadītājs, Dr.chem. Dr.chem. Māris Lauberts: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzents Mg. chem. Māris Bērtiņš: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (ieraksta sekretārs)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre,
lektore: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)