

FAKULTETA ZA TEHNOLOGIJO POLIMEROV

Tanja MODRIJAN

**SOLUBILIZACIJA IN DEPOLIMERIZACIJA
CELULOZE Z GLOBOKO EVTEKTIČNIMI TOPILI**

Diplomsko delo

Slovenj Gradec, junij 2025

FAKULTETA ZA TEHNOLOGIJO POLIMEROV

SOLUBILIZACIJA IN DEPOLIMERIZACIJA CELULOZE Z GLOBOKO EVTEKTIČNIMI TOPILI

Diplomsko delo

Študentka:	Tanja MODRIJAN
Študijski program:	Tehnologija polimerov
Mentor:	izr. prof. dr. Blaž LIKOZAR
Delovna mentorica:	dr. Filipa Alexandra ANDRE VICENTE

Slovenj Gradec, junij 2025

IZJAVA

Podpisana Tanja Modrijan izjavljam, da:

- je bilo predloženo diplomsko delo opravljeno samostojno pod mentorstvom;
- predloženo diplomsko delo v celoti ali v delih ni bilo predloženo za pridobitev kakršnekoli izobrazbe na drugi fakulteti ali univerzi;
- soglašam z javno dostopnostjo diplomskega dela v knjižnici Fakultete za tehnologijo polimerov v Slovenj Gradcu. Na Fakulteto za tehnologijo polimerov neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve diplomskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi diplomsko delo javnosti na svetovnem spletu preko repozitorija DiRROS.

Slovenj Gradec, _____

Podpis: _____

ZAHVALA

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Blažu Likozarju za mentorstvo ter delovni mentorici dr. Filipi Alexandri Andre Vicente za usmeritve in strokovno pomoč pri snovanju diplomskega dela.

Hvala tudi Moniki Vidmar in Kristini Andrejc za strokovno usmerjanje pri opravljanju eksperimentalnega dela.

Hvala tudi vsem, ki so mi v času študija stali ob strani in mi dajali vzpodbudo in podporo.

POVZETEK

Solubilizacija in depolimerizacija celuloze z globoko evtektičnimi topili

Namen našega dela je bil raziskati topnost celobioze v globoko evtektičnih topilih (DES; *angl.* deep eutectic solvents). Pripravili smo pet DES iz holin klorida in organskih kislin. V pripravljenih DES smo raztapljali celobiozo pri dveh različnih temperaturah. Nasičene raztopine smo centrifugirali in supernatante analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Ugotovili smo, da je bila celobioza najboljše topna v topilu iz holin klorida in oksalne kisline. Na boljšo topnost vpliva tudi povišana temperatura. Topnost celobioze v topilu holin klorid:oksalne kisline (1:1) je bila pri 60 °C, 135 mg/g. Ugotavljamo, da je kombinacija holin klorida in oksalne kisline dobro topilo za celobiozo, zato bi bile smiselne nadaljne raziskave vpliva različnih sestav topila in različnih temperatur na izboljšanje topnosti celobioze.

Ključne besede:

Globoko evtektična topila, holin klorid, celobioza, solubilizacija, kromatografija.

SUMMARY

Cellulose solubilization and depolymerization in eutectic solvents

The aim of our work was to investigate the solubility of cellobiose in deep eutectic solvents (DES). Five DES were prepared from choline chloride and organic acids. Cellobiose was dissolved in the prepared DES at two different temperatures. The saturated solutions were centrifuged and the supernatants were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC). We found that cellobiose was the most soluble in the choline chloride and oxalic acid solvent. The better solubility is also influenced by the elevated temperature. The solubility of cellobiose in choline chloride:oxalic acid solvent (1:1) was 135 mg/g at 60 °C. We conclude that the combination of choline chloride and oxalic acid is a good solvent for cellobiose, and further investigations on the effect of different solvent compositions and temperatures on the improvement of the solubility of cellobiose would be worthwhile.

Keywords:

Deep eutectic solvents, choline chloride, cellobiose, solubilization, chromatography.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Opis področja dela	1
1.2	Cilji, hipoteze in omejitve	2
1.3	Metode	2
1.4	Kratek opis dela	3
2	TEORETIČNI DEL	4
2.1	Lignocelulozna biomasa	4
2.2	Globoko evtektična topila	6
2.2.1	Predstavitev in vrste globoko evtektičnih topil	6
2.2.2	Fizikalno kemijske lastnosti DES	8
2.3	Kromatografija	12
2.3.1	Vrste kromatografij	13
3	EKSPERIMENTALNI DEL	17
3.1	Uporabljene kemikalije	17
3.2	Vsebnost vlage v reagentih	17
3.3	Priprava globoko evtektičnih topil in vzorcev za analizo topnosti celobioze	18
3.4	HPLC analiza	20
3.5	Izračun koncentracij celobioze v analiziranih vzorcih	22
4	REZULTATI IN DISKUSIJA	23
4.1	Rezultati meritev vsebnosti vlage v reagentih	23
4.2	Izris umeritvene krivulje	24
4.3	Rezultati meritev topnosti celobioze v globoko evtektičnih topilih	25
5	SKLEP	29
	SEZNAM LITERATURE IN VIROV	30
	SEZNAM SLIK	32
	SEZNAM TABEL	33
	SEZNAM UPORABLJENIH SIMBOLOV	34
	SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC	35

1 UVOD

1.1 Opis področja dela

Okoljski izzivi predstavljajo velike oziroma ekstremne spremembe na Zemlji. Te nas zaradi pomanjkanja fosilnih virov soočajo z dejstvom, da je treba preiti s tehnologij fosilnih goriv na tehnologije, ki temeljijo na obnovljivih virih energije. Tehnologije s področja obnovljivih virov energije postajajo vedno bolj stroškovno konkurenčne. Tako bi obnovljivi viri odločno prehiteli običajne tehnologije, ki temeljijo na fosilnih virih. V cenah energije bi se tako morali bolje odražati vplivi obnovljivih virov na okolje – emisije v zrak, podnebje in vodo v povezavi s proizvodnjo in uporabo energije. Obnovljivi viri energije so ključ do dolgoročnih prizadevanj za ublažitev podnebnih sprememb in bodo imeli vedno večjo vlogo pri izboljševanju skupne energetske varnosti [1].

Pariški sporazum iz leta 2015 je zgodovinsko pomemben mejnik v svetovnem boju proti podnebnim spremembam in je prvi večstranski dogovor o podnebnih spremembah, ki zajema skoraj vse emisije. Sporazum je potrditev poti Evropske unije v nizkoogljično prihodnost in bo svet usmeril k splošnemu prehodu k čistejši energiji, ponuja zadnjo priložnost za predajo stabilnejšega sveta, bolj zdravega planeta, pravičnejše družbe in uspešnejša gospodarstva prihodnim generacijam. Evropska unija je zastavila ambiciozen cilj za celotno gospodarstvo, in sicer da do leta 2030 emisije toplogrednih plinov zmanjša vsaj za 40 %. Cilj temelji na svetovnih napovedih, ki so skladne s srednjeročnimi cilji pariškega sporazuma. Sporazum določa dinamičen mehanizem za pregleda stanja in postopno krepitev ambicioznosti. Evropska unija bo sodelovala pri prvem svetovnem pregledu stanja leta 2023, ki je pomemben za proučitev postopno ambicioznejšega ukrepanja vseh pogodbenic za obdobje po letu 2030. Tako se bodo države pogodbenice od leta 2023 vsakih pet let srečale za »svetovni pregled stanja«, na katerem bodo obravnavale napredek pri zmanjševanju emisij, prilagajanju ter zagotovljeni in prejeti podpori glede na dolgoročne cilje sporazuma [2].

Krožno gospodarstvo temelji na zmanjševanju količine odpadkov in recikliranju izdelkov. Ideja je oblikovala politična prizadevanja. Politiki, ki se tega problema čedalje bolj zavedajo, se s svojimi prizadevanji odzivajo tako na okoljske kot gospodarske izzive. Vendar samo razmišljati o pretvorbi odpadkov v dragocene izdelke ne bo zadostovalo, trenutno so namreč procesi izolacije še vedno predragi in škodujejo okolju. Materiale, ki trenutno veljajo za odpadke majhne vrednosti, je treba obravnavati kot obnovljive surovine v kemijskem sektorju v prihodnosti. Tako bi rešitev problema predstavljal razvoj koncepta biorafinerije, ki je predelovalni obrat za pretvorbo biomase v izdelke z dodano vrednostjo in ki bi omogočil zmanjšanje količine proizvedenih odpadkov ter recikliranje izdelkov. V dobi, ko sta biorafinerija in krožno gospodarstvo ključnega pomena za trajnostno svetovno družbo in gospodarstvo, je potrebno razviti stroškovno učinkovite in okolju prijazne procese, kjer morajo biti vse operacije skrbno izbrane ter medsebojno integrirane. Tako je interdisciplinarna ekipa raziskovalcev

Kemijskega inštituta v Ljubljani, ki pokriva področja oblikovanja kemijskega inženirstva, kemije, materialov, napovednih znanosti o okolju in gospodarstva, sodelovala pri razvoju trajnostnega koncepta biorafinerije za pridobivanje več različnih produktov iz odpadnih lupin škampov. Vse procesne bioprodukte iz odpadnih lupin škampov so predelali, izolirali in prečistili. Uporabili so samo neškodljiva topila, in sicer vodo, očetno kislino v blagih pogojih in pufre. Ko so model ocenili z vidika učinkovitosti čiščenja, ekonomskega tveganja in ocene življenjskega cikla, so ugotovili, da gre za uspešen poslovni model, ki temelji na bioekonomiji in trajnostnem gospodarstvu [3,4].

Biotransformacije so zelene in trajnostne tehnologije, ki vključujejo okolju prijazna topila, procese skupaj z gospodarskim razvojem, varovanje okolja ter ohranjanje naravnih virov. Kot privlačna alternativa za uporabo pri predelavi biomase in bioloških odpadkov v različnih tehnologijah ekstrakcije, ločevanja in čiščenja so se pojavila globoko evtektična topila (DES; *angl.* deep eutectic solvents). Delujejo tudi kot izjemni reakcijski mediji in/ali katalizatorji za več namenov. DES oblikujemo z kombinacijami donorjev in akceptorjev vodikovih vezi. Zasnovani so na kvarternih amonijevih spojinah, sladkorjih, organskih kislinah in aminokislinah. Iz tega razloga imajo bolj trajnosten in biološko razgradljiv značaj kot običajna topila, kar pripomore k razvoju bolj zelenih industrijskih procesov. Za vsako posamezno nalogo lahko oblikujemo specifičnega, hkrati pa prilagodimo njihov zeleni značaj in biokompatibilnost [4].

1.2 Cilji, hipoteze in omejitve

Zaradi okoljske ozaveščenosti smo se odločili, da bomo pripravili pet DES z namenom raztapljanja celobioze. Poskušali smo ugotoviti topnost celobioze v različnih DES. Po opravljeni HPLC analizi smo topila med seboj primerjali ter ugotavljali optimalno formulacijo topila, v katerem je topnost celobioze največja.

Predpostavljamo, da bomo uspeli pripraviti DES, ki bodo omogočila solubilizacijo celobioze.

Ker je celuloza kompleksen polimer, bi za pretvorbo v glukozne enote morali opraviti še kislinsko hidrolizo, kar bi podaljšalo reakcijske čase. Tako smo se odločili raziskati topnost celobioze, ki je manj kompleksna molekula in jo je lažje analizirati.

1.3 Metode

Tekom priprave diplomskega dela smo:

- zbirali, pregledovali in študirali literaturo s področja priprave in uporabe globoko evtektičnih topil za izvedbo solubilizacije celobioze,
- pripravili lastne vzorce globoko evtektičnih topil z različnimi kombinacijami donorjev in akceptorjev vodikovih vezi v različnih razmerjih ter dodali določeno količino celobioze,
- analizirali vzorce z uporabo HPLC,

- ovrednotili dobljene rezultate in izbrali najboljše topilo.

Vzorci globoko evtektičnih topil s celobiozo smo pripravili z opremo v lasti Kemijskega inštituta, kasneje jih bomo okarakterizirali z analitsko opremo, ki je prav tako na voljo na Kemijskem inštitutu.

1.4 Kratek opis dela

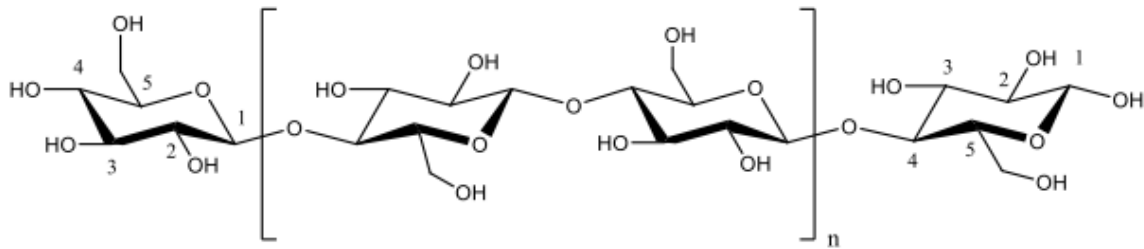
Diplomsko delo smo pričeli z merjenjem vsebnosti vode, ki je prisotna v različnih donorjih in akceptorjih vodikove vezi ter izračunom količin kemikalij, potrebnih za pripravo DES z namenom raztapljanja celobioze. Po opravljenih izračunih smo pričeli s pripravo petih različnih DES. Nato smo v eppendorfove epruvete »zatehtali« določeno količino celobioze in dodali določeno količino DES. Sledilo je segrevanje naših vzorcev pri različnih temperaturah in nato še njihovo centrifugiranje. Tako smo dobili pelete neraztopljene celobioze in supernatant, ki je predstavljal naš vzorec za analizo. Topnost celobioze v različnih DES smo določili s HPLC.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Lignocelulozna biomasa

Lignocelulozna biomasa je najbolj razširjena obnovljiva surovina in bistveno cenejša od surove nafte. Posledično se je povečalo zanimanje za razvoj kemikalij, pridobljenih iz lignocelulozne biomase. Tako so se s pomočjo tehnologij biorafiniranja iz lignocelulozne biomase razvile tehnologije za proizvodnjo različnih platformnih kemikalij. To so sladkorni alkoholi, organske kisline, furfural in hidroksi metil furfural, ki imajo potencial za pretvorbo v kemikalije na biološki osnovi visoke vrednosti in v zelene polimere. V zadnjem času se je zanimanje za polimere iz obnovljive lignocelulozne biomase znatno povečalo. Številne platformne kemikalije pridobljene iz lignocelulozne biomase se lahko uporabljajo kot novi materiali za sintezo polimerov na biološki osnovi. Te materiale je mogoče natančno zasnovati na molekularni ravni v obnovljive vire z uporabo pristopov, podobnih tistim za kemikalije na osnovi nafte. Lignocelulozna biomasa je sestavljena predvsem iz treh polimerov, in sicer iz: celuloze (35–50 %), hemiceluloze (20–35 %) in lignina (10–25 %). Disaharidna celobioza, sestavljena iz enot D-glukoze, ki so med seboj povezane z β -1,4 glikozidnimi vezmi, je ponavljajoča se enota celulozne verige, kar je razvidno iz slike 1. Polimerne verige celuloze imajo visoko kristalno strukturo, ki je odporna na depolimerizacijo [5].

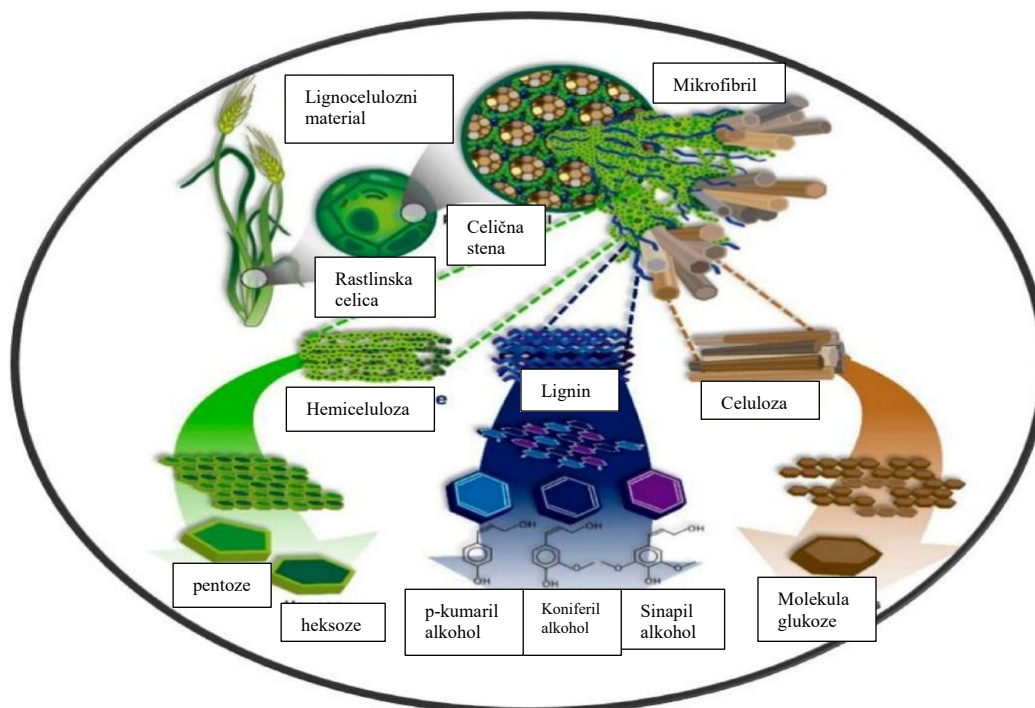
Molekula celuloze, v kateri sta sosednji molekuli glukoze obrnjeni za 180° , ima množico hidroksilnih skupin, ki tvorijo močne vodikove vezi, tako intramolekularne kot intermolekularne. Zaradi vodikovih vezi se molekule celuloze združujejo, kristalizirajo in orientirajo v vlaknasto strukturo. Molekule tvorijo primarne fibrile (protofibrili), ki se združujejo v večje mikrofibrile (2–20 nm), ti pa v vlakna. Celuloze iz različnih virov se ne razlikujejo le v strukturi, pač pa tudi v molski masi oziroma stopnji polimerizacije, ki je odvisna tudi od načina njenega pridobivanja oziroma obdelave surovine. Celuloza iz lesa ima stopnjo polimerizacije 300–1700, bombaž od 800 do 10000, podobno tudi bakterijska celuloza. Celuloza ni popolnoma kristalinična, pač je kot večina polimerov sestavljena iz amorfnih in kristalnih delov. Velikost kristalov ter njihov delež vplivata tako na mehanske kot kemijske lastnosti celuloze. Največjo stopnjo kristaliničnosti ima celuloza iz alg (> 80 %), nekoliko manjšo bakterijska (65–79 %). Vse ostale vrste imajo med 45 in 65 % kristalinične faze. Celuloza je zaradi močnih vodikovih vezi in kristaliničnosti netopna v vodi in večini drugih topil. Topi se v zmesi dimetilacetamida in LiCl, tetrabutylamonijevega fluorida trihidrata in dimetilsulfoksida (DMSO), v bakrovem etilendiaminu in bakrov-amonijevem hidroksidu. Večina teh topil je uporabna za karakterizacijo celuloze in njenih derivatov. Industrijsko uporabno topilo je le raztopina NaOH, v kateri celuloza le nabreka. Celuloza v koncentriranih kislinah (H_2SO_4 , HCl, HNO_3 ...) razpada [6].



Slika 1: Kemijska struktura celuloze [6]

Hemiceluloze ali lesne polioze so necelulozni polisaharidi in so drugi najpomembnejši polimer v lignocelulozni biomasi. Za razliko od celuloze jih sestavljajo različne sladkorne enote, npr. različne oblike heksoz (v glavnem manani) in pentoz (večina so ksilani) ali galaktoznih enot (galaktanov). Njihove molekularne verige so precej krajše od celuloze in razvejane. Polimerizacijska stopnja polioz je okrog 200. Polioze so topne v vodi, kjer hidrolizirajo v svoje monomerne komponente, in v lugih. Hemiceluloze so amorfne polisaharidne verige, ki se nalagajo v vmesne prostorčke med celuloznimi mikrofibrilami, za razliko od celuloze imajo nižjo molekulsko maso in se lažje razgradijo [7,8].

Lignin predstavlja tretjo in najbolj kompleksno komponento lignocelulozne biomase. Lignin je mešan polimerizat iz treh osnovnih gradnikov: p-kumaril alkohola, koniferil alkohola in sinapil alkohola. Lignin je tridimenzionalni polimer; ki ni kemična spojina v klasičnem smislu, saj nima enotne strukture, niti določljive relativne molekulske mase. Potem ko se odložita celuloza in hemiceluloze, lignin zapolni medcelične prostore in prostore v celični steni. Po končani lignifikaciji (olesenitvi) kot tridimenzionalne tvorbe zapolnijo prostore med fibrilami celične stene. Olesenitev predstavlja vključevanje lignina v celulozni skelet celične stene, s čimer se zmanjša njena prepustnost ter poveča togost in trdnost. Čiste celulozne stene bi prepuščale vodo in v njej raztopljene snovi. Lignin se veže na celulozne molekule z močnimi kovalentnimi vezmi in tako nastane skupek celuloze, ki je čvrsta na nateg in lignina, ki je odporen na tlak. Za razliko od nitastih celuloznih molekul so lignini mrežasto prepleteni. Delno je topen v alkoholu in nekaterih organskih kislinah [7,8]. Struktura lignocelulozne biomase je prikazana na sliki 2.

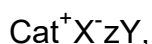


Slika 2: Struktura lignocelulozne biomase [9]

2.2 Globoko evtektična topila

2.2.1 Predstavitev in vrste globoko evtektičnih topil

Začetno študijo s področja DES so leta 2001 opravili Abbott in sodelavci [4], ko so merili tališča topil pripravljenih iz različnih kvarternih amonijevih soli in ZnCl_2 . Najnižje temperature tališča ($23\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$) so izmerili, ko je bil holin klorid uporabljen kot kvarтерна amonijeva sol. Osnovno strukturo DES lahko ponazorimo s splošno formulo [10]:



pri čemer je:

- Cat^+ - ponazarja kation, predstavniki so lahko amonijev, fosfonijev ali sulfonijev kation,
- X^- - v formuli ponazarja Lewisovo bazo, običajno je to halogenidni anion,
- Y - ponazarja Lewisovo ali Brønstedovo kislino, ki sodeluje pri tvorbi anionskega kompleksa z X^- ,
- z - se nanaša na število molekul Y .

Prvo poročilo [4] o uporabi DES za predelavo lignocelulozne biomase je iz leta 2012, ko je bila ocenjena topnost lignina v DES, sestavljenega iz do 15 masno-masnih odstotkov (m/m %) jabolčne kisline in prolina. Celuloza pa je bila popolnoma netopna ali komaj topna v večini pripravljenih DES. Od takrat se je uporaba DES za razgradnjo lignocelulozne biomase znatno povečala, posebno v zadnjih petih letih. Globoko evtektična topila predstavljajo zeleno alternativo konvencionalnim topilom. Zaradi

svoje biorazgradljivosti, biokompatibilnosti ter netoksičnosti predstavljajo novo generacijo topil. Tališča DES so veliko nižja od tališč posameznih komponent. Predobdelava z DES je ključna za rahljanje in nabrekanje strukture celuloznih vlaken, tako je omogočena fibrilacija celuloze. Olajšana je tudi hidroliza in raztapljanje amorfnih regij celuloze, kar spodbuja tvorbo nanokristalov. DES lahko tudi cepijo kovalentne vezi, ki so vzpostavljene med ligninom in hemicelulozo ter vodikove vezi, ki povezujejo lignin in celulozo [4].

Obstajajo velike razlike med DES in ionskimi tekočinami (IL). Osrednja je ta, da so ionske tekočine čiste spojine, medtem ko so DES mešanice. Najpogosteje so mešanice med solmi in molekularnimi spojinami (tip III) ali samo mešanice dveh molekularnih spojin (tip V). Čeprav so lahko DES tipa I sestavljeni izključno iz ionskih vrst (DES tipa II so sestavljeni iz vode), ostajajo mešanica. DES tipa IV predstavlja mešanica kovinskega klorida hidrata in donorja vodikove vezi [11]. Po drugi strani prvotna definicija DES navaja, da so DES sistemi oblikovani iz eutektične mešanice Lewisovih ali Brønstedovih kislin ali baz, ki lahko vsebujejo različne anionske in/ali kationske vrste. Ta koncept DES je zelo pomemben, ker nakazuje, da prisotnost vodikove vezi med donorjem in akceptorjem ni dovolj za nastanek DES. Za njihovo tvorbo je potrebno nekaj razlike v kislosti med donorjem in akceptorjem. Vendar morajo biti razlike v kislosti med temi sistemi majhne, drugače bi prišlo do prenosa protonov, in namesto DES bi nastale protične ionske tekočine. To je tudi razlog, da zmesi karboksilnih kislin ali alkoholov ne moremo šteti za DES, ker v teh primerih ni mešanice Lewisovih ali Brønstedovih kislin in baz [12].

Iz tabele 1 je razvidno, da so DES večinoma razvrščeni glede na kombinacijo uporabljenih reagentov.

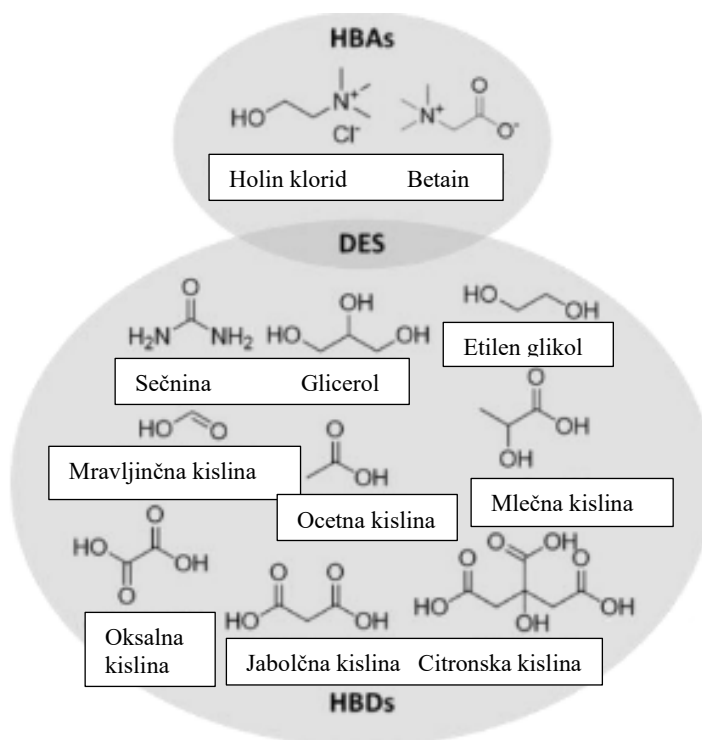
Tabela 1: Predstavitev tipov DES [10]

Tip DES	Splošna formula	Razlaga simbolov
I	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x$	M=Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x\cdot\text{yH}_2\text{O}$	M=Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zRZ}$	Z=CONH ₂ , COOH, OH
IV	MCl_x+RZ	M=Al, Zn in Z=CONH ₂ , OH

DES tipa I so oblikovani iz kvarternih amonijevih soli in različnih kovinskih kloridov, **DES tipa II** so oblikovani iz kvarternih amonijevih soli in kovinskih kloridov hidratov. **DES tipa III** so oblikovani iz kvarternih amonijevih soli in donorjev vodikove vezi. Znanstveniki jim posvečajo več pozornosti kot DES I in II, ki so manj stabilni v vodnem mediju. Običajno so pripravljene iz holin klorida in donorja vodikove vezi. Širok nabor razpoložljivih donorjev vodikove vezi omogoči natančnejšo prilagoditev za specifične namene, poleg tega so tudi fizikalne lastnosti topila odvisne od njih. DES tipa III so zanimivi tudi z vidika topnosti, v njih se raztapljajo številne zvrsti prehodnih kovin, kot so kloridi in oksidi. **DES tipa IV** so oblikovani iz kovinskih kloridov in donorjev vodikove

vezi. Anorganski kationi na splošno ne tvorijo evtektične mešanice z nizkim tališčem zaradi svoje gostote naboja. Vendar so študije pokazale, da lahko mešanice kovinskih halogenidov s sečnino tvorijo evtektično mešanico, ki ima tališče nižje od 150 °C, tako npr. ZnCl_2 , kljub pričakovanju, da kovinske soli običajno ne ionizirajo v nevodnih medijih, tvori evtektično zmes tudi z acetamidom, etilen glikolom in 1,6-heksandiolom. Tako so Smith in sodelavci [10] dokazali, da je vrsto prehodnih kovin mogoče vključiti v evtektične mešanice pri sobni temperaturi, ki sedaj imenujemo DES tipa IV. **DES tipa V** pa so zmesi neionskih komponent s sladkorji, organskimi kislinami, alkoholi ali polialkoholi in aminokislinami.

Razvit je bil tudi hidrofobni DES, ki temelji na akceptorjih vodikove vezi, kot so mentol, timol in maščobne kisline v kombinaciji z donorji vodikove vezi, kot so dolgoverižni alkoholi in karboksilne kisline [13]. Na sliki 3 so predstavljeni najbolj pogosti donorji in akceptorji vodikovih vezi, ki se jih uporablja v predobdelavi lignocelulozne biomase.



Slika 3: Donorji in akceptorji vodikovih vezi [4]

2.2.2 Fizikalno kemijske lastnosti DES

Toplotne lastnosti

Toplotne lastnosti DES imajo pomembne prednosti. Študij v zvezi s toplotno stabilnostjo DES je relativno malo. Na toplotno stabilnost DES najbolj vplivajo vodikove vezi. DES se na splošno razgradijo najprej na HBA (*ang.* Hydrogen bond acceptors) in HBD (*ang.* Hydrogen bond donors) pri visokih temperaturah z oslavitvijo interakcij vodikovih vezi. S pričetkom segrevanja najprej poteče izhlapevanje ali pa razgradnja

HBD, ki imajo relativno nizka vrelišča in nižjo stabilnost kot HBA. Pri višjih temperaturah sledi izhlapevanje ali pa razgradnja HBA. Na primer, najbolj pogosto uporabljen akceptor vodikove vezi, holin klorid začne razpadati pri 250 °C. Bolj kot je HBD temperaturno obstojen, višja bo začetna temperatura termičnega razpada ustreznega DES. Vendar DES, če ga dlje časa izpostavimo temperaturi, pri kateri se začne termični razpad, ni dolgo obstojen. Zaradi tega raziskovalci menijo, da so domnevanja o povečani termični obstojnosti DES precenjena. Toplotna stabilnost DES širi nabor področij, na katerih se lahko potencialno uporabljajo, med drugim kemijska sinteza, kataliza in shranjevanje energije. Glede na dejstvo, da je DES evtektična kombinacija dveh ali več spojin, lahko za razliko od tipičnih topil ostane tekoč pri visokih temperaturah. Temperatura ima ključno vlogo pri vplivu na fizikalno-kemijske lastnosti DES. Tako se z višanjem temperature viskoznost DES zmanjšuje, kar omogoča lažje mešanje z drugimi snovmi. Poleg tega se prevodnost DES povečuje s temperaturo, zaradi česar je primeren za elektrokemijske aplikacije. Zaradi svoje temperaturne odvisnosti se DES kaže kot vsestransko in prilagodljivo topilo, ki se uporablja v različnih procesih in industrijah. Razumevanje temperaturno odvisnih lastnosti DES je ključnega pomena za izkoriščanje njihovega polnega potenciala na različnih področjih [13,14].

Viskoznost

Viskoznost, ki je definirana kot upornost tekočine proti pretakanju, ima ključno vlogo pri učinkovitosti topil, kot so DES. Viskoznost topila določa, kako zlahka se lahko širi in prodira v različne materiale. Tako so DES z nizko viskoznostjo običajno primernejši zaradi boljšega prenosa mase, kar je ključno za učinkovite postopke ekstrakcije. Dejavniki, ki vplivajo na viskoznost so: temperatura, tlak in sestava topila. Višja temperatura daje molekulam več energije, zaradi česar se molekule prosto gibljejo in posledično zmanjšajo viskoznost DES. Tlak vpliva na viskoznost tako, da molekule stisne tesneje skupaj, kar povzroči povečanje viskoznosti. Poleg tega lahko spremembe v viskoznosti povzročijo tudi spreminjanje sestave DES s prilagajanjem razmerij komponent ali dodajanjem drugih spojin. Običajno se viskoznost pri nastajanju DES povečuje zaradi močne interakcije med sestavinami. Ta pojav se zlahka zazna, ko sta obe sestavini tekoči pri sobni temperaturi [13].

Gostota

Na gostoto DES vplivajo izbira komponent, temperatura in tlak. Poznavanje gostote DES omogoča lažje povečanje njegove učinkovitosti na različnih področjih industrije. S spreminjanjem razmerja uporabljenih komponent je mogoče gostoto DES prilagoditi posebnim potrebam uporabe. Spremembe temperature in tlaka pa lahko povzročijo spremembo razporeditve molekul v topilu. Tako se lahko gostota DES prilagodi gostoti materialov, s katerimi je v interakciji, kar omogoča učinkovito mešanje in zmanjšuje težave z ločevanjem faz. Gostota DES ima na primer ključno vlogo pri ločitvi faz in učinkovitosti ekstrakcije. Učinkovitost ekstrakcije je mogoče povečati z uskladitvijo

gostote DES z gostoto ciljne spojine. Tako kot pri viskoznosti se gostota DES v primerjavi z njegovimi sestavinami zaradi močne interakcije med njimi močno poveča [13].

Vpliv pH

Za zagotavljanje učinkovitih in uspešnih reakcij v DES je ključnega pomena skrbno uravnavanje pH. Za nadzor pH se lahko uporabijo metode, kot sta uporaba puferskih raztopin in prilagajanje razmerja komponent v topilu. Z nadzorom pH lahko raziskovalci natančno prilagodijo lastnosti topil, kot so sposobnost raztapljanja določenih spojin, njihove pretočne lastnosti in katalitična aktivnost. pH DES lahko bistveno vpliva na njihove lastnosti in delovanje, vključno s topnostjo, viskoznostjo in katalitično aktivnostjo. Kombinacija HBD in HBA v DES prispeva k stabilnem pH okolju. Sestave DES s kislimi sestavinami imajo na splošno nižje vrednosti pH, medtem ko imajo sestave z bolj bazičnimi sestavinami običajno višje vrednosti pH. Na primer, DES na osnovi hlin klorida in karboksilnih kislin ohranjajo rahlo kisel pH zaradi karboksilatnih ionov. DES, ki vsebujejo nevtralne sestavine ali monokislinsko in monobazno sol v enakih molekulskih razmerjih, pa imajo običajno nevtralne vrednosti pH [13].

Polarnost

Polarnost ima ključno vlogo pri uporabi DES v procesih kemičnega raztapljanja. Polarnost je opredeljena kot neenakomerna porazdelitev električnih nabojev v molekuli. Tako je en konec vezi relativno negativno nabit, drugi konec pa relativno pozitivno nabit. Ker je v topilih z višjo polarnostjo več ionov, ki lahko prenašajo električni naboj, ti imajo boljše prevodnost. DES z manjšo polarnostjo ima lahko slabšo prevodnost, ker je na voljo manj ionov za prenos naboja [13].

Hidrofilnost, hidrofobnost

Večina DES je hidrofilnih, vendar so se s časom pojavile tudi hidrofobne sestave, ki se ne mešajo z vodo. Ker lahko hidrofobni DES ustvarijo dvofazni sistem, je splošno znano, da je ta lastnost pomembna za ekstrakcijo topljenca. Po dodatku DES v vodno raztopino, se zaradi hidrofobnih interakcij med komponentami DES oblikuje ločena faza, kar vodi do nastanka dvofaznega sistema. Hidrofilni DES ima omejene možnosti za postopke, ki zahtevajo nepolarna topila. Polarnost komponent DES je odločilni dejavnik pri določanju hidrofilnosti in hidrofobnosti topila. Hidrofilnost in hidrofobnost lahko določimo z merjenjem kontaktnih kotov kapljice DES na referenčni površini z določeno polarnostjo [13].

Parni tlak

Parni tlak DES je običajno nižji od parnega tlaka organskega topila, kar je zaželeno v znanstvenem in industrijskem sektorju. V tem smislu se lahko DES uporablja za

nadomeščanje hlapnih organskih spojin, s čimer se znatno zmanjša onesnaževanje ozračja ter nevarnosti, povezane z izpostavljenostjo uporabnikov ali drugimi tveganji, kot so vnetljivost hlapov [13].

Vsebnost vode

DES so na splošno higroskopične zmesi, katere jo težko popolnoma posušiti. Pri absorpciji in dodajanju vode v DES je potrebno upoštevati dvojne lastnosti vode. Voda lahko interagira s HBA in HBD v DES, kar je razlog, da organska sol in donor vodikove vezi tvorita več vodikovih vezi. Molekule vode lahko na primer oslabijo vodikovo vez med holin kloridom in sečnino ter tvorijo vodikovo vez s sečnino. Količina vode v DES ali dodajanje vode k njemu vpliva na njegove fizikalno kemijske lastnosti in biokompatibilnost. Povečana vsebnost vode v DES zniža tališče, gostoto in viskoznost, obenem pa pretrga vodikove vezi med posameznimi sestavinami DES in poveča ionsko gibljivost. Zaradi povečane ionske gibljivosti se prevodnost DES z razredčevanjem do določene meje poveča [13].

Toksičnost

Za tista DES, ki so sestavljena iz naravnih komponent, je mogoče pričakovati, da so nestrupena in biorazgradljiva. Ta predpostavka temelji na neškodljivosti vsake od posameznih komponent. Pri vrednotenju toksikoloških lastnosti je treba upoštevati možnost sinergijskega učinka med komponentami DES. Tako bi bilo potrebno v bližnji prihodnosti izvesti tudi več študij o toksičnosti in biološki razgradljivosti posameznih DES. Samo na ta način je mogoče ugotoviti toksičnost in biorazgradljivost DES, ki so potencialno primerne tudi na drugih področjih uporabe, kot npr. v prehrabeni in farmacevtski industriji [15].

Biorazgradljivost

DES iz naravnih komponent, kot »bolj zelena« alternativa običajnim hlapnim organskim spojinam se tržijo kot stroškovno učinkovite, okolju prijazne, nestrupene in biorazgradljive. Študij o biorazgradljivosti DES in njihovem vplivu na okolje je še vedno malo. Nekaterih sestavin za pripravo DES ni mogoče šteti za biološko razgradljive. Da bi topilo lahko imenovali zeleno, mora izpolnjevati določene kriterije: mora biti obnovljivo, stroškovno učinkovito, trajnostno, nestrupeno in biorazgradljivo. Biorazgradljivost se nanaša na razgradnjo ali pretvorbo spojine, ki jo katalizirajo mikroorganizmi in/ali encimi in povzroči izgubo biološke aktivnosti. Ko spojina prestane posebne presejalne teste za končno biorazgradljivost v skladu s smernicami z organizacijo za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), je razvrščena kot »zlahka razgradljiva«. Ugotovitve o biorazgradljivosti DES je treba primerjati z biorazgradljivostjo njegovih posameznih komponent. V bodoče bo potrebno posvetiti več pozornosti biorazgradljivosti DES [16].

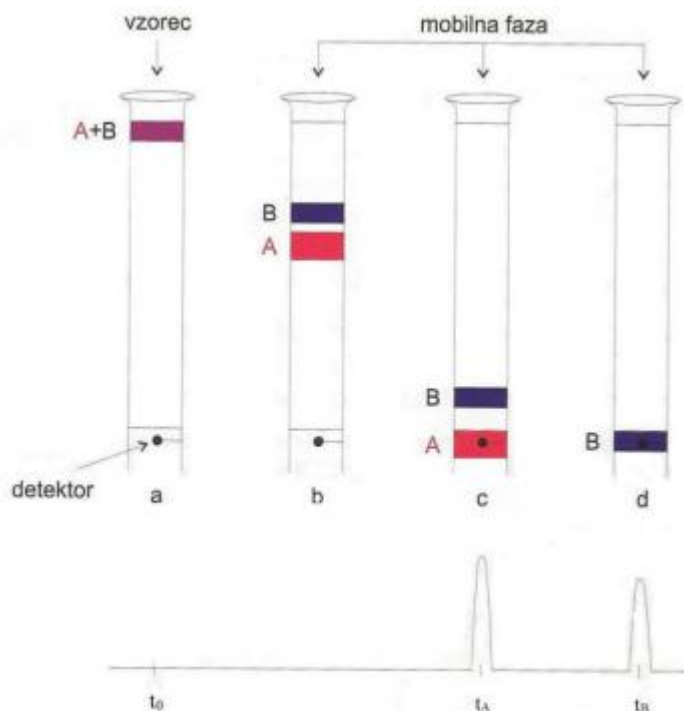
2.3 Kromatografija

Kromatografija je analizna metoda ločevanja posameznih komponent vzorca, ki nato zaznamo z ustrezno detekcijo. Metoda omogoča tako kvalitativno analizo, s pomočjo katere lahko identificiramo sestavine, kot tudi kvantitativno analizo, ki nam omogoča določiti količine oziroma koncentracije posameznih sestavin zmesi [17].

Kromatografijo je prvi uporabil ruski botanik Mikhail Tswett v začetku dvajsetega stoletja. Uporabil je tehniko za ločevanje različnih rastlinskih pigmentov, kot so klorofili in ksantofili, tako da je raztopine teh spojin spustil skozi stekleno kolono napolnjeno z delci kalcijevega karbonata. Ob pronicanju tekočine skozi stolpec so se pojavile ločene vrste kot barvni trakovi, kar je razlog za ime, ki ga je izbral za metodo (grško *chroma* pomeni barva in *graphein* pomeni pisati). Grafični zapis je poimenoval kromatogram [17].

Kromatografske tehnike omogočajo najkompleksnejše separacije, ki so sicer z drugimi tehnikami nedosegljive. Vsi kromatografski sistemi so sestavljeni iz dveh faz, ki se med seboj ne mešata, to sta stacionarna in mobilna faza. Vzorec je raztopljen v mobilni fazi, ki je lahko plin, tekočina ali superkritična tekočina in skupaj z njo potuje skozi stacionarno fazo, ki je nanešena v kolono ali drug primeren nosilec [17].

Komponente vzorca se v različnih stopnjah porazdelijo med mobilno in stacionarno fazo, kar je posledica različnih fizikalnih interakcij s stacionarno fazo oziroma mobilno fazo. Tako se pri kromatografiji izkorišča molekulska masa, oblika, hidrofilnost oziroma lipofilnost molekul ter njihova specifična afiniteta do drugih komponent. Tiste komponente, ki jih stacionarna faza močno zadrži, se premikajo počasi s tokom mobilne faze. Komponente, ki jih stacionarna faza slabše zadržuje, pa potujejo hitreje. Posledica razlik v mobilnosti oziroma različnih časov zadrževanja komponent na koloni ali drugem nosilcu stacionarne faze je njihova ločba. Potek ločevanja vzorca, sestavljenega iz komponent A in B je prikazan na sliki 4. Iz slike je razvidno, da je vzorec nanešen na kolono ob času t_0 . Ob konstantnem dodajanju mobilne faze se komponente vzorca porazdelijo med dve fazi. Mobilna faza, ki konstantno prehaja skozi kolono, potiska komponente vzorca vzdolž stacionarne faze. Zaradi različne afinitete komponent A in B do stacionarne oziroma mobilne faze pride do ločitve – najprej se eluira komponenta A, ki ima manjšo afiniteto do stacionarne faze ter nato še komponenta B, ki ima večjo afiniteto do stacionarne faze in se v njej dlje časa zadržuje. Signal iz detektorja predstavljata dva kromatografska vrhova s pripadajočima retencijskima časoma (t_1 in t_2). Retencijski čas je čas, ki je potreben za pojav vrha komponente v kromatogramu in sovpada s časom zadrževanja v koloni [17,18].



Slika 4: Potek ločitve vzorca, ki vsebuje komponenti A in B ter signal na detektorju [18]

2.3.1 Vrste kromatografij

Obstaja precej različnih vrst kromatografskih tehnik, v grobem se jih najpogosteje deli na podlagi agregatnega stanja, v katerem se nahaja mobilna faza. Na podlagi te delitve obstajajo naslednji tipi kromatografije:

Plinska kromatografija (GC)

Pri plinski kromatografiji je mobilna faza običajno inerten plin (helij, dušik, argon ...), uporablja se tudi vodik. Vedno gre za kolonsko kromatografijo. Med analiti in plinom ni interakcij, temveč jih slednji le prenaša vzdolž kolone [19].

Tekočinska kromatografija (LC)

Pri tekočinski kromatografiji je mobilna faza kapljevina – voda, vodne raztopine, organska topila, ionske tekočine in različne zmesi navedenega. Uporablja se pri planarni in kolonski kromatografiji. Analiti so v interakciji tako s stacionarno kot z mobilno fazo [19].

Superkritična kromatografija (SCF)

Pri superkritični kromatografiji je mobilna faza superkritična tekočina, ki ima fizikalno-kemijske lastnosti nekje med plinom in tekočino. Vedno gre za kolonsko

kromatografijo. Odvisno od narave superkritične tekočine so lahko analiti v interakciji le s stacionarno fazo ali pa z obema [19].

Tekočinska kromatografija visoke ločljivost (HPLC)

Glavni sestavi deli HPLC sistema so:

Rezervoar

Rezervoar s topilom predstavlja prvo komponento sistema. Vsaka sodobna HPLC naprava je opremljena z enim ali več rezervoarji iz stekla ali nerjavečega jekla, od katerih vsak vsebuje 500 ml ali več topila. Rezervoarji so pogosto opremljeni s sredstvi za odstranjevanje raztopljenih plinov, običajno kisika in dušika, ki motijo z tvorbo mehurčkov v detektorskih sistemih. Tako so rezervoarji opremljeni z razplinjevalniki, ki omogočajo prepihanje z inertnim plinom, npr. helijem. Sistemi pogosto vsebujejo tudi sredstva za filtriranje prahu in trdnih delcev iz topil. Ločevanje, pri katerem se uporablja eno samo topilo s konstantno sestavo, se imenuje izokratska elucija. Ločevanje je primerno za zmesi spojin s podobno polarnostjo. Pogosto se učinkovitost ločevanja močno poveča z gradientno elucijo. Ločevanje je primerno za zmesi spojin z različno polarnostjo, tekom analize je možno spreminjanje sestave mobilne faze. V tem primeru se uporabljata dva ali več sistema topil, ki se bistveno razlikujejo v polarnosti. Oprema za HPLC je pogosto opremljena z napravami, ki dovajajo topila iz dveh ali več rezervoarjev v mešalno komoro s hitrostmi, ki se nenehno spreminjajo. Volumsko razmerje topil se lahko nato s časom spreminja linearno ali eksponentno [17].

Črpalka

Osnova vsakega HPLC sistema je črpalka, ki poganja mobilno fazo skozi cel sistem in ustvarja delovni pritisk med 240 in 400 bari. Zagotavljati mora enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Pri analitskem delu mora zadoščati številnim zahtevam kot so: brezpulzno delovanje, konstanten pretok (zaželeno je široko območje pretokov mobilne faze od 0,1 do 10 ml/min) ter ponovljivost. Pomembna je tudi odpornost komponent črpalke proti koroziji, tako morajo biti tesnila iz nerjavečega jekla ali teflona. Črpalka je lahko izokratska, kar pomeni, da črpa skozi kolono le eno mobilno fazo s konstantnim razmerjem topil, ali pa binarna, terciarna ali kvartarna, kadar omogoča mešanje dveh, treh ali štirih različnih topil. To nam omogoča gradientno elucijo snovi iz kolone, ki jo je moč doseči s poljubnim spreminjanjem razmerij med več komponentami mobilne faze [17,20].

Injektor

Vbrizgavanje vzorca na kolono pri HPLC analizi mora biti karseda hitro, kajti pretok mobilne faze mora biti konstanten od kolone do detektorja. Mogoče je doseči s

posebnim visokotlačnim ventilom, imenovanim injektor. Ta je lahko ročni ali avtomatski, ima več pretočnih poti in je nameščen tik pred kolono. Tak ventil mora vzdržati tlake večje od 30.000 kPa [21].

Kolona

Kolona je ravna cev iz nerjavečega jekla, ki meri v dolžino 3 do 5 cm. Notranja stena je včasih pokrita z inertnim materialom, kot sta lahko steklo ali PEEK. Stacionarna faza je v koloni med dvema poroznima diskoma. Za zaščito kolone se pogosto uporabljajo predkolone, ki so kratke (od 0,4 do 1 cm) in so napolnjene z enako stacionarno fazo kot analitska kolona. Predkolona zadržuje spojine z $R_f = 0$ in tako preprečuje kontaminacijo [21].

Stacionarna faza

Osnovni material za večino stacionarnih faz je silikagel, ki je trden, polaren in amorfen material. Princip delovanja temelji na adsorpciji, ki vodi do kopičenja spojine na stiku med stacionarno in mobilno fazo [21].

Mobilna faza

Ker je možno spreminjanje sestave mobilne faze in s tem njene polarnosti, je izbira optimalne mobilne faze pri HPLC metodi zelo pomembna. Polarnost stacionarne faze lahko vpliva na dva načina. Če je stacionarna faza polarna, se tehnika imenuje normalno fazna kromatografija. Mobilna faza je manj polarna. Če je stacionarna faza nepolarna ali pa le šibko polarna, se tehnika imenuje reverzno fazna kromatografija (RP-HPLC). Mobilna faza je polarna [21].

Detektor

Sistemi tekočinske kromatografije so sklopljeni z različnimi detektorji, ki omogočajo tako kvalitativno kot kvantitativno določanje. Nekateri izmed najpogostejših tipov detektorjev pri HPLC analizi so:

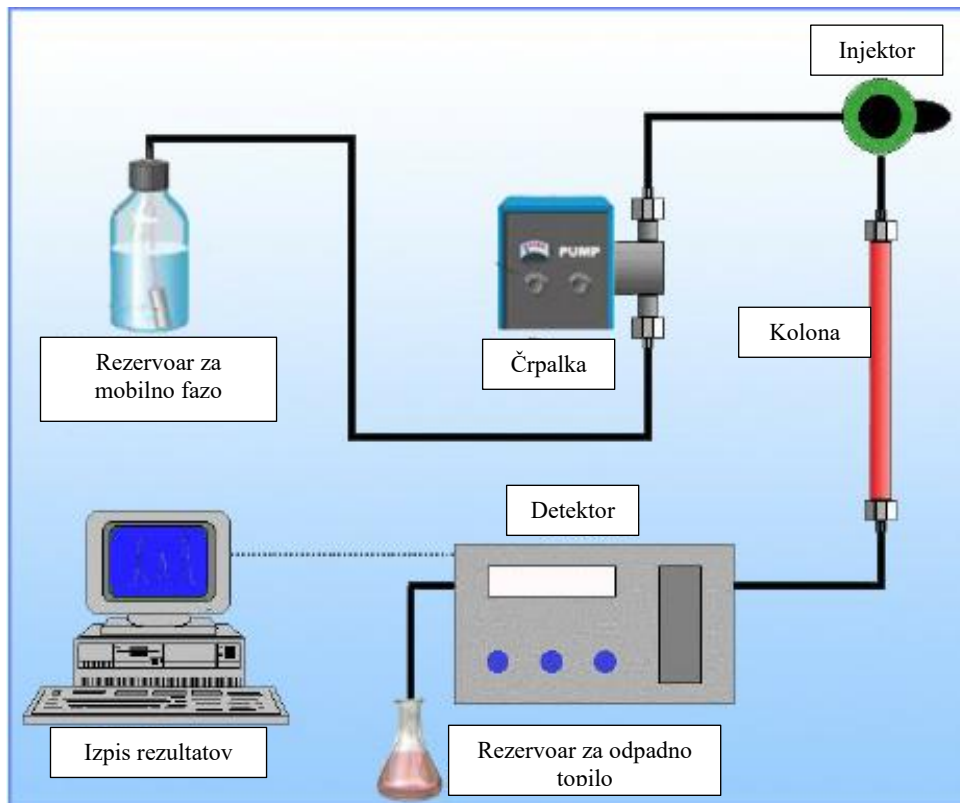
Absorpcijski detektor, ki deluje v območju ultravijolične in vidne svetlobe (UV-VIS). Tovrstni detektorji so najpogosteje v rabi. Nekateri izmed njih imajo tudi možnost snemanja absorpcijskih spektrov, kar omogoča pridobiti pomembno informacijo o strukturi analitov.

Fluorescentni detektor, ki ima določene prednosti pred UV-VIS detektorjem, predvsem nižjo mejo določitve analitov. Njegova raba je omejena zgolj na spojine, ki fluorescirajo.

Detektor, ki deluje na principu refrakcijskega indeksa (RI detektor). Je skoraj univerzalen detektor, a ima precej omejeno uporabnost zaradi specifičnih pogojev, ki

so potrebni za njegovo optimalno delovanje, to so razmeroma visoke koncentracije analitov in izokratska elucija. Najpogosteje je v rabi za določevanje sladkorjev.

Izparilni detektor, ki deluje s sipanjem svetlobe (ELSD detektor). Je sodobnejši tip detektorja, ki nadomešča predvsem RI detektor [17]. Slika 5 prikazuje osnovne komponente HPLC sistema.



Slika 5: Shema HPLC sistema [22]

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Uporabljene kemikalije

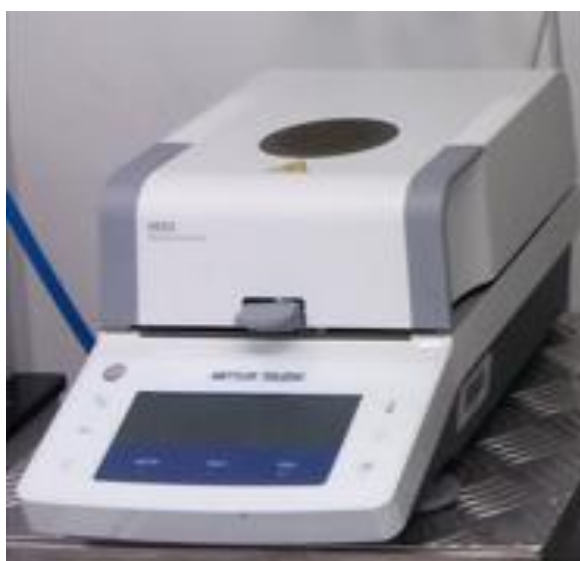
Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje kemikalije:

- holin klorid (≥ 98 %, Sigma - Aldrich),
- citronska kislina ($\geq 99,5$ %, Sigma - Aldrich),
- jabolčna kislina (99 %, Sigma - Aldrich),
- oksalna kislina (98 %, Sigma - Aldrich),
- mlečna kislina (85 %, Sigma - Aldrich),
- očetna kislina (glacialna, 100 %, Merck),
- celobioza (≥ 98 %, Sigma - Aldrich),
- deionizirana ultračista voda Mili-Q (Kemijski inštitut).

3.2 Vsebnost vlage v reagentih

Eksperimentalni del smo pričeli z merjenjem vsebnosti vlage v reagentih. Predstavniki HBA je bil holin klorid, predstavniki HBD-jev so bile mlečna, očetna, citronska, jabolčna in oksalna kislina.

Vsebnost vode v mlečni in očetni kislini smo določili s Karl-Fischerjevo titracijo. Za določitev vode v preostalih reagentih smo uporabili analizator vlage (Mettler Toledo, HE 53). Na aluminijast pladenj smo razporedili določeno količino (najmanj 0,5 g) reagenta in ga vstavili v aparaturo. Ko smo zaprli pokrov aparature, je aparatura segrela vzorec do 106 °C in pričela z merjenjem vsebnosti vlage. Merjenje vlage je potekalo tako dolgo, dokler vsa vlaga, ki jo je vzorec vseboval, ni izhlapela. Po pisku naprave je bila meritev končana, odčitali smo vsebnost vlage. Analizator vlage ki smo ga uporabili, je prikazan na sliki 6.



Slika 6: Analizator vlage

3.3 Priprava globoko eutektičnih topil in vzorcev za analizo topnosti celobioze

Pripravili smo pet različnih DES na osnovi holin klorida in različnih donorjev vodikove vezi ob dodatku 30 m/m % destilirane vode, z izjemo oksalne kisline, ko smo dodali 75 m/m % destilirane vode. Mlečna kislina je kot kristalohidrat že vsebovala vodo, zato smo mlečni kislini dodali sorazmerno manjši dodatek vode do skupnega utežnega deleža 30 m/m %. V tabeli 2 smo navedli izbrane kombinacije ter molska razmerja holin klorida (ChCl) in donorjev vodikove vezi.

Tabela 2: Kombinacije HBA in HBD ter molska razmerja za pripravo DES

Oznaka	HBA	HBD	Molsko razmerje HBA:HBD
DES 1	ChCl	Mlečna kislina	1:2
DES 2	ChCl	Ocetna kislina	1:2
DES 3	ChCl	Citronska kislina	1:2
DES 4	ChCl	Jabolčna kislina	1:2
DES 5	ChCl	Oksalna kislina	1:1

Za izračun kemikalij smo uporabili enačbo 1 in enačbo 2.

$$n = \frac{m}{M} \quad (1),$$

pri čemer je:

- n - množina (mol),
- m - masa (g),
- M - molska masa (g/mol).

$$\frac{n_{HBA}}{n_{HBD}} = \frac{1}{1} \quad (2),$$

pri čemer je:

- n_{HBA} – množina akceptorja vodikove vezi (mol),
- n_{HBD} – množina donorja vodikove vezi (mol).

Ob upoštevanju ustreznih molskih mas, molskih razmerij ter vsebnosti vode, smo izračunali mase reagentov, potrebnih za pripravo DES. Reagente smo zatehtali z analitsko tehtnico proizvajalca Kern, ki je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Analitska tehtnica

Tako pripravljena topila smo segrevali v oljni kopeli 2 h pri 80 °C in tako dobili prozorno tekočino. Nato smo v eppendorfove epruvete natehtali 150 mg celobioze in 500 mg topila, kar je prikazano na sliki 8. Za vsak DES smo pripravili 3 ponovitve. Vzorce smo potem segrevali: prvi set vzorcev na 40 °C in drugi set vzorcev na 60 °C. Čas segrevanja s termičnim stresalnikom je bil 1 h pri številu tresljajev 1200/min.



Slika 8: Oljna kopel z DES in termični stresalnik

Sledilo je centrifugiranje s centrifugirko proizvajalca IKA-GL (slika 9), 5 min pri 10000 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo sediment zavrgli, supernatante pa ohranili za nadaljno analizo. Supernatanti so bili nasičene raztopine celobioze v DES.



Slika 9: Centrifuga

3.4 HPLC analiza

Kromatografsko analizo smo izvedli s HPLC napravo Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 ob uporabi kolone Rezex™ RHM-Monosaccharide H⁺ pri 60 °C. Za mobilno fazo smo uporabili 5 mM H₂SO₄ s hitrostjo pretoka 0,6 mL/min. Celobiozo smo zaznali z RI detektorjem tipa RefractoMax 520. Vrh celobioze je bil pri retencijskem času 9,167 min. Pri tem času smo odčitali površino pod krivuljo. Za izdelavo umeritvene premice smo uporabili standard celobioze pripravljene v 6 m/m % H₂SO₄.

S pomočjo umeritvene premice smo ob upoštevanju 10-kratnega redčenja izračunali koncentracijo celobioze.

Slika 10 prikazuje napravo, s katero smo izvedli našo analizo, slika 11 pa prikazuje uporabljen RI detektor.



Slika 10: Aparatura za HPLC analizo



Slika 11: RI detektor

V tabeli 3 so prikazani parametri HPLC analize.

Tabela 3: Parametri HPLC meritve

Kolona	Rezex™ RHM-Monosaccharide H ⁺
Mobilna faza	5 mM žveplova (VI) kislina
Pretok mobilne faze	0,6 mL/min
Temperatura	60 °C
Detektor	Refraktometrični detektor (RI, angl. refractive index detector)

3.5 Izračun koncentracij celobioze v analiziranih vzorcih

Linearnost - umeritvena krivulja

Odvisnost med koncentracijo in odzivom je v našem primeru linearna. S pomočjo raztopin znane koncentracije smo izdelali umeritveno krivuljo z enačbo 3:

$$A = 1,1634 c - 0,1086 \quad (3),$$

pri čemer je:

- c - koncentracija celobioze (mg/g)
- A - odziv (površina pod krivuljo na kromatogramu – arbitrarna enota).

Iz enačbe izrazimo koncentracijo:

$$c = \frac{A+0,1086}{1,1634} \text{ in upoštevamo še 10 - kratno redčenje vzorca}$$

$$c = \frac{(A+0,1086)}{1,1634} \times 10$$

Tako smo dobili končno obliko enačbe za izračun koncentracije celobioze v pripravljenih vzorcih celobioze v DES.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Rezultati meritev vsebnosti vlage v reagentih

Iz tabele 4 vidimo, da se vsebnost vlage reagentov za pripravo DES giblje med 0,23-13,87 %. Delež vode za mlečno in očetno kislino smo določili s Karl-Fischer titracijo. Vsebnosti vode za jabolčno, citronsko, oksalno kislino in holin klorid so povprečne vrednosti treh meritev z analizatorjem vlage. Rezultati meritev so bili upoštevani za izračune ustreznih mas za pripravo naših DES.

Tabela 4: Rezultati vsebnosti vode v reagentih za pripravo DES

Reagenti	Vsebnost vode [%]
Mlečna kislina	13,87
Očetna kislina	0,07
Jabolčna kislina	0,23
Citronska kislina	0,25
Oksalna kislina	1,33
Holin klorid	0,27

Na podlagi meritev vsebnosti vode v reagentih smo izračunali mase HBD in HBA. Tabela 5 prikazuje mase holin klorida (HBA), ustrezne organske kisline (HBD) in vode. S tako pripravljenimi DES smo naredili nasičene raztopine celobioze, ki smo jih nadalje analizirali s pomočjo HPLC, želeli smo namreč ugotoviti v katerem DES je celobioza najbolj topna.

Tabela 5: Mase holin klorida (HBA) in kislin (HBD) ter vode za pripravo DES.

Oznaka	HBA	HBD	Molsko razmerje HBA:HBD	m HBA (g)	m HBD (g)	m voda(g)
DES 1	ChCl	Mlečna kislina	1:2	9,02	11,61	3,33
DES 2	ChCl	Očetna kislina	1:2	11,07	9,5	6,17
DES 3	ChCl	Citronska kislina	1:2	6,08	13,03	5,73
DES 4	ChCl	Jabolčna kislina	1:2	9,42	9,02	5,53
DES 5	ChCl	Oksalna kislina	1:1	7,88	5,07	9,71

Primer izračuna komponent za DES 1, upoštevajoč vsebnost vode 13,87 % v mlečni kislini glede na predpostavljeno maso 10 g brezvodne kisline:

$$M(\text{ChCl}) = 139,62 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}) = 90,08 \text{ g/mol}$$

$$m(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}) = \frac{10 \text{ g}}{(1-0,1387)} = 11,61 \text{ g}$$

$$m(\text{ChCl}) = \frac{M(\text{ChCl}) \cdot m(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH})}{2 \cdot M(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH})} = 9,00 \text{ g}$$

Ob upoštevanju vode 0,27 % v ChCl bo masa ChCl znašala:

$$m(\text{ChCl}) = 9,00 \text{ g} + (9,00 \cdot 0,0027) \text{ g} = 9,02 \text{ g}$$

Masa vode pa bo znašala:

$$m(\text{H}_2\text{O}) = (11,61 \text{ g} + 9,02 \text{ g}) \cdot (0,3 - 0,1387) = 3,33 \text{ g}$$

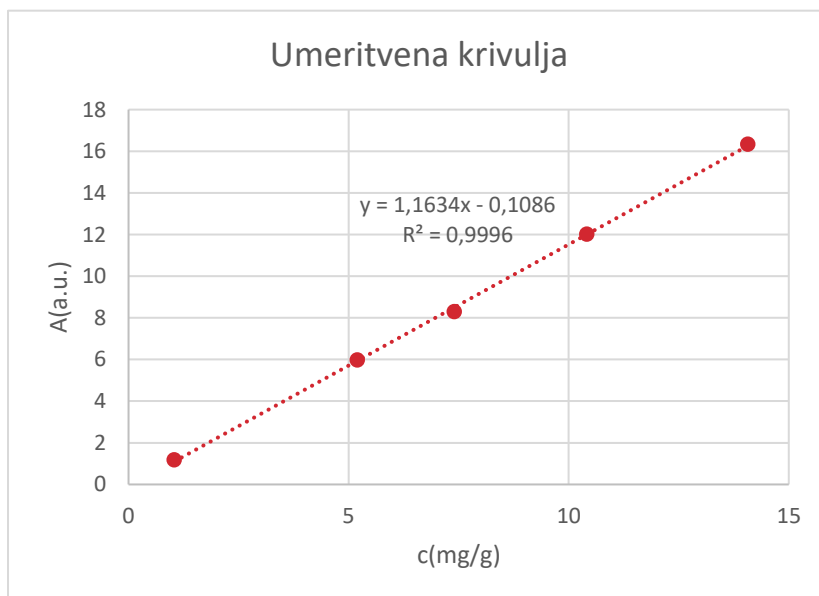
4.2 Izris umeritvene krivulje

V nadaljevanju smo izrisali umeritveno premico s pomočjo Excel programa, s katero smo določali koncentracijo celobioze v DES.

Standardne raztopine smo pripravili v petih koncentracijah (1,04–14,07 mg/g) po enakem postopku. Iz dobljenih meritev površin kromatografskih vrhov je program Excel po metodi najmanjših kvadratov izrisal regresijsko premico in določil njene parametre. Dobljen korelacijski koeficient umeritvene krivulje (R^2) znaša 0,9996, kar potrjuje linearen odziv metode v območju pripravljenih koncentracij celobioze. Rezultati so prikazani v tabeli 6, umeritvena premica je prikazana na sliki 12.

Tabela 6: Koncentracije celobioze in ploščine kromatografskih vrhov

c(celobioza) (mg/g)	A(celobioza)
14,07	16,3369
10,41	12,0151
7,4	8,2989
5,2	5,98
1,04	1,1743



Slika 12: Umeritvena krivulja za celobiozo

4.3 Rezultati meritev topnosti celobioze v globoko eutektskih topilih

S pomočjo izdelane umeritvene krivulje je programska oprema Excel izračunala koncentracijo raztopljene celobioze v DES. Na sliki 13 je prikazana tabela, kjer je v zadnjem stolpcu navedena povprečna koncentracija s standardnim odklikom.

	DES	C(celobioza)			C(celobioza)		Povprečje koncentracij ± SD(celobioza)	
		m(celobioza) [mg]	m(DES) [g]	pred raztapljanjem	A(celobioza)	mg/g DES		
60°C	ChCl: Acetic acid (1:2)	150,92	0,50617	298,160697	2,7508	24,58	25,04 ± 0,35	
		150,56	0,50652	297,243939	2,8116	25,10		
		150,75	0,50747	297,0618953	2,8512	25,44		
	ChCl: Lactic acid (1:2)	150,27	0,50546	297,2935544	2,1947	19,80	20,15 ± 0,30	
		149,84	0,49821	300,756709	2,2332	20,13		
		150,7	0,49987	301,4783844	2,2805	20,54		
	ChCl: Malic acid (1:2)	149,55	0,50331	297,1329797	3,5508	31,45	30,34 ± 0,27	
		150,23	0,50296	298,6917449	3,4933	30,96		
		150,55	0,5164	291,5375678	3,5681	31,60		
	ChCl: Citric acid (1:2)	150,9	0,49804	302,9877118	3,1436	27,95	28,76 ± 0,57	
		150,05	0,501	299,500998	3,2813	29,14		
		150,64	0,50048	300,9910486	3,288	29,20		
	ChCl: Oxalic acid (1:1)	150,59	0,50879	295,9767291	15,4186	133,46	134,99 ± 1,20	
		149,44	0,5037	296,6845344	15,7592	136,39		
		150,05	0,51007	294,1753093	15,611	135,12		
	40°C	ChCl: Acetic acid (1:2)	150,55	0,5032	299,1852146	1,7461	15,94	15,76 ± 0,25
			150,89	0,50233	300,3802281	1,6833	15,40	
			150,72	0,50523	298,3195772	1,7452	15,93	
ChCl: Lactic acid (1:2)		150,6	0,501	300,5988024	1,5477	14,24	14,18 ± 0,15	
		150	0,4792	313,0217028	1,5181	13,98		
		150,9	0,50344	299,7378039	1,5581	14,33		
ChCl: Malic acid (1:2)		150,3	0,50505	297,5942976	2,3806	21,40	21,42 ± 0,18	
		150	0,4966	302,053967	2,3583	21,20		
		150,8	0,50113	300,919921	2,4098	21,65		
ChCl: Citric acid (1:2)		150,4	0,49822	301,8746738	2,2218	20,03	19,86 ± 0,21	
		150,1	0,50119	299,4872204	2,215	19,97		
		151	0,50103	301,3791589	2,1673	19,56		
ChCl: Oxalic acid (1:1)		150,75	0,50266	299,904508	12,7449	110,48	111,08 ± 0,51	
		149,93	0,50203	298,6474912	12,8074	111,02		
		149,91	0,50216	298,5303489	12,8908	111,74		

Slika 13: Izračun koncentracij celobioze

Primer izračuna koncentracije celobioze za DES 2, prva ponovitev pri 60 °C:

$$C = \frac{(2,7508 + 0,1086)}{1,1634} \times 10 = 24,58 \text{ mg/g DES}$$

Ugotovili smo, da je bila celobioza v vseh DES boljše topna pri višji temperaturi (60 °C), saj so bile njene koncentracije višje pri vseh analiziranih DES.

Celobioza je bila pri temperaturi 60 °C najslabše topna v DES, ki je narejen iz ChCl in mlečne kisline. Najbolje je topna v DES z ChCl in oksalno kislino. V tem DES smo izmerili koncentracijo 135 mg/g.

Podobne rezultate, z nekoliko nižjimi koncentracijami smo dobili pri temperaturi 40 °C; celobioza je najslabše topna v DES, ki je narejen iz ChCl in mlečne kisline, najboljše pa v DES z ChCl in oksalno kislino. Pri tej temperaturi smo izmerili koncentracijo 111 mg/g.

Iz rezultatov opazimo, da so koncentracije v prvih štirih DES primerljive, DES pripravljen z oksalno kislino pa precej odstopa. Topnost v tem topilu je, pri temperaturi 60 °C, približno 5 x večja kot v ostalih DES, pri temperaturi 40 °C pa tudi do 6 x. Zanimivo je tudi opažanje, da se topnost celobioze v DES ChCl:oksalna kislina s povišanjem temperature izboljša relativno manj kot pri ostalih topilih, kjer ima povišanje temperature znaten vpliv na izboljšanje topnosti.

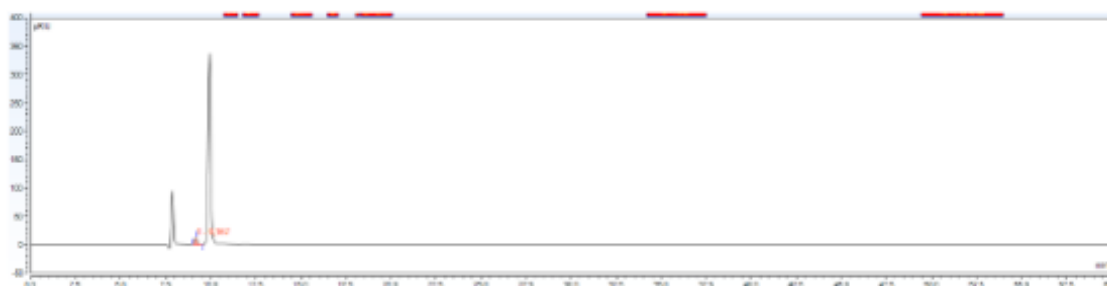
V nadaljevanju so rezultati kromatografske analize (slike 14 – 19). Vrh celobioze opazimo pri retencijskem času 9,167 minute. Sestava DES je opisana v točki 3.3.



Slika 14: Kromatogram za DES 1



Slika 15: Kromatogram za DES 2



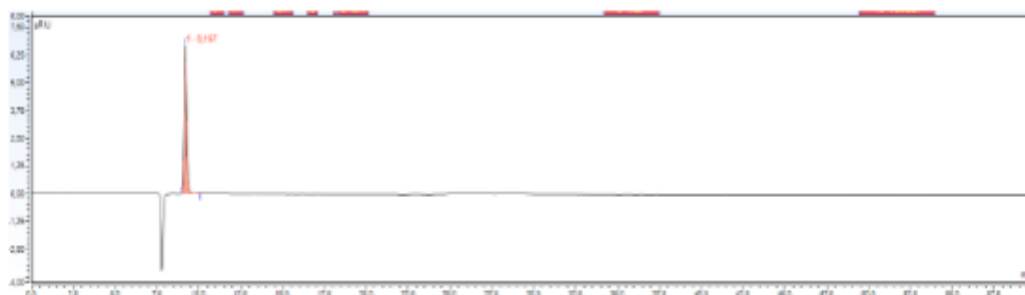
Slika 16: Kromatogram za DES 3



Slika 17: Kromatogram za DES 4



Slika 18: Kromatogram za DES 5



Slika 19: Kromatogram standarda celbioze koncentracije 1 mg/mL

Rezultate smo primerjali z izsledki drugih raziskav. Lynam in sodelavci (2017) [23], so v svoji študiji objavili rezultate topnosti celuloze v DES iz holin klorida in mlečne kisline v razmerju 1:10, v katerem je bila topnost pri 60 °C manjša od 3 %. Naš DES je bil sestavljen iz ChCl in mlečne kisline v razmerju 1:2, v njem pa se je raztopilo približno 20 mg celbioze na gram topila pri 60 °C, kar pomeni približno 2 %. Čeprav je celuloza polisaharid, celbioza pa disaharid, je rezultat primerljiv. Možno bi bilo celo sklepati, da večji delež mlečne kisline v DES poveča topnost.

V DES iz holin klorida in očetne kisline v razmerju 1:2, je bila topnost celuloze pri 60 °C manjša od 1 % [23]. V našem primeru je bila topnost celbioze v enakem DES pri enaki temperaturi 2,5 %. Topnost celbioze je v tem primeru večja, kar je pričakovano, saj je celbioza manjša molekula od celuloze.

Chen in sodelavci (2019) [24] so v svojem članku objavili preglednico topnosti celuloze iz različnih virov, pri različnih temperaturah, v različnih DES. Za primerjavo lahko

vzamemo topnost bombažnih celuloznih vlaken v DES iz ChCl in sečnine v razmerju 1:2, pri 120 °C. Topnost je bila 1,43 m/m %.

Nadalje je bila topnost celuloze s čistoto >98 % v DES iz ChCl in maleinske kisline v razmerju 1:1 pri 90 °C 2,57 m/m %. V DES iz ChCl in resorcinola v razmerju 1:1 pri 90 °C pa kar 6,1 m/m % [24].

Naše vrednosti topnosti celobioze v različnih DES se pri 60 °C gibljejo nekje med 2 in 3 %. Močno pa odstopa DES iz ChCl in oksalne kisline v razmerju 1:1, kjer je topnost kar 13 %. Iz primerjave z drugimi avtorji lahko sklepamo, da so povprečne topnosti celuloze v DES nekje do 3 %, obstaja še kar veliko potenciala za izboljšanje topnosti. To je mogoče doseči tako s prilagoditvijo sestave in razmerja komponent v DES kot tudi s povišanjem temperature.

5 SKLEP

Cilj našega diplomskega dela je bil pripraviti globoko evtektično topilo, v katerem bi lahko raztopili čim večjo količino celobioze. V ta namen smo pripravili pet različnih kombinacij holin klorida in organskih kislin. V pripravljenih topilih smo raztapljali celobiozo pri dveh različnih temperaturah (40 in 60 °C), toliko časa, da je nastala nasičena raztopina. Netopni del smo odstranili s centrifugiranjem. Supernatante smo analizirali s HPLC analizo.

Ugotovili smo, da je bila topnost celobioze v štirih pripravljenih topilih primerljiva, odstopalo je globoko evtektično topilo pripravljeno iz holin klorida in oksalne kisline. V tem topilu se je raztopilo od 5 do 6 x več celobioze kot v ostalih topilih.

Tudi temperatura vpliva na topnost. Pri dvigu temperature iz 40 °C na 60 °C se je topnost v DES ChCl: oksalna kislina izboljšala za približno 20 mg/g, kar pomeni 2 %.

V diplomskem delu smo ugotovili, da bi za raztapljanje celobioze, izmed pripravljenih topil, uporabili kombinacijo holin klorida in oksalne kisline, pri povišani temperaturi.

Zanimivo bi bilo raziskati učinke DES, pripravljena iz različnih razmerij holin klorida in oksalne kisline, saj se je v nalogi izkazalo, da ima oksalna kislina pomemben vpliv na topnost celobioze. Sklepamo, da k temu prispeva struktura molekule oksalne kisline; ta je namreč tako donor kot tudi akceptor vodikovih vezi in lahko v velikem obsegu interagira z molekulo celobioze.

Zanimivo bi bilo raziskati tudi, katera je optimalna temperatura za raztapljanje celobioze in do katere temperature topnost narašča.

Raziskave na tem področju omogočajo nove načine uporabe odpadne biomase za namen proizvodnje energije.

SEZNAM LITERATURE IN VIROV

- [1] European Environment Agency, Obnovljiva energija: ključ do nizkoogljične evropske prihodnosti — Evropska agencija za okolje, (2021). <https://www.eea.europa.eu/sl/articles/obnovljiva-energija-kljuc-do-nizkoogljične> (accessed June 21, 2024).
- [2] Evropska komisija, SPOROČILO KOMISIJE EVROPSKEMU PARLAMENTU IN SVETU, Bruselj, 2016.
- [3] F.A. Vicente, S.P.M. Ventura, H. Passos, A.C.R.V. Dias, M.A. Torres-Acosta, U. Novak, B. Likozar, Crustacean waste biorefinery as a sustainable cost-effective business model, *Chemical Engineering Journal* 442 (2022). <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2022.135937>.
- [4] Everaldo Silvino dos Santos, Complimentary Contributor Copy, 2022.
- [5] X. Ge, C. Chang, L. Zhang, S. Cui, X. Luo, S. Hu, Y. Qin, Y. Li, Conversion of Lignocellulosic Biomass Into Platform Chemicals for Biobased Polyurethane Application, in: *Advances in Bioenergy*, Elsevier, 2018: pp. 161–213. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2018.03.002>.
- [6] Miroslav. Huskić, Funkcionalni polimeri povzetek predavanj : 2019/2020, Fakulteta za tehnologijo polimerov, 2020.
- [7] Katarina Čufar, Anatomija lesa: Univerzitetni učbenik, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2006.
- [8] I.L. Jožica Polanc, Les - zgradba in lastnosti, Zveza lesarjev Slovenije, Lesarska založba, Ljubljana, 2004.
- [9] M.U. Khan, M. Usman, M.A. Ashraf, N. Dutta, G. Luo, S. Zhang, A review of recent advancements in pretreatment techniques of lignocellulosic materials for biogas production: Opportunities and Limitations, *Chemical Engineering Journal Advances* 10 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100263>.
- [10] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications, *Chem Rev* 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [11] M. Ivanović, M.I. Razboršek, M. Kolar, Innovative extraction techniques using deep eutectic solvents and analytical methods for the isolation and characterization of natural bioactive compounds from plant material, *Plants* 9 (2020) 1–29. <https://doi.org/10.3390/plants9111428>.
- [12] D.O. Abranches, J.A.P. Coutinho, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering Everything You Wanted to Know about Deep Eutectic Solvents but Were Afraid to Be Told, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2023 14 (2023) 141–163. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng>.
- [13] D.S. Freitas, A. Cavaco-Paulo, C. Silva, Enhancing insights into the phenomena of deep eutectic solvents, *Sustainable Materials and Technologies* 41 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2024.e01039>.

- [14] W. Chen, Z. Xue, J. Wang, J. Jiang, X. Zhao, T. Mu, Investigation on the thermal stability of deep eutectic solvents, *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Physico - Chimica Sinica* 34 (2018) 904–911. <https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201712281>.
- [15] G.M. Martínez, G.G. Townley, R.M. Martínez-Espinosa, Controversy on the toxic nature of deep eutectic solvents and their potential contribution to environmental pollution, *Heliyon* 8 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12567>.
- [16] A. Azzouz, M. Hayyan, Are deep eutectic solvents biodegradable?, *Process Safety and Environmental Protection* 176 (2023) 1021–1025. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.06.079>.
- [17] J.J.L. Douglas A. Skoog, *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing, Orlando, 1992.
- [18] J.K. Borut Štrukelj, *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.
- [19] H.P. Boris Pihlar, *Osnove analizne kemije*, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2019.
- [20] P.M.K.S.T.T. Gregor Anderluh, *Eksperimentalne metode v biokemiji*, Študentska založba, Ljubljana, 2009.
- [21] F. Rouessac, A. Rouessac, *Chemical Analysis Second Edition*, 2007.
- [22] F. Salvato, M.C. da C. Gallo de Carvalho, A. de Lima Leite, Strategies for Protein Separation, in: *Integrative Proteomics*, InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/29363>.
- [23] J.G. Lynam, N. Kumar, M.J. Wong, Deep eutectic solvents' ability to solubilize lignin, cellulose, and hemicellulose; thermal stability; and density, *Bioresour Technol* 238 (2017) 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.079>.
- [24] Y.L. Chen, X. Zhang, T.T. You, F. Xu, Deep eutectic solvents (DESs) for cellulose dissolution: a mini-review, *Cellulose* 26 (2019) 205–213. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2130-7>.

SEZNAM SLIK

Slika 1: Kemijska struktura celuloze [6]	5
Slika 2: Struktura lignocelulozne biomase [9]	6
Slika 3: Donorji in akceptorji vodikovih vezi [4]	8
Slika 4: Potek ločitve vzorca, ki vsebuje komponenti A in B ter signal na detektorju [18]	13
Slika 5: Shema HPLC sistema [22]	16
Slika 6: Analizator vlage	17
Slika 7: Analitska tehtnica	19
Slika 8: Oljna kopel z DES in termični stresalnik	19
Slika 9: Centrifuga	20
Slika 10: Aparatura za HPLC analizo	21
Slika 11: RI detektor	21
Slika 12: Umeritvena krivulja za celobiozo	24
Slika 13: Izračun koncentracij celobioze	25
Slika 14: Kromatogram za DES 1	26
Slika 15: Kromatogram za DES 2	26
Slika 16: Kromatogram za DES 3	26
Slika 17: Kromatogram za DES 4	27
Slika 18: Kromatogram za DES 5	27
Slika 19: Kromatogram standarda celobioze koncentracije 1 mg/mL	27

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Predstavitev tipov DES [10]	7
Tabela 2: Kombinacije HBA in HBD ter molska razmerja za pripravo DES	18
Tabela 3: Parametri HPLC meritve	22
Tabela 4: Rezultati vsebnosti vode v reagentih za pripravo DES	23
Tabela 5: Mase holin klorida (HBA) in kislin (HBD) ter vode za pripravo DES.	23
Tabela 6: Koncentracije celobioze in ploščine kromatografskih vrhov	24

SEZNAM UPORABLJENIH SIMBOLOV

m - masa (kg)

n - množina snovi (mol)

m - masa (g)

M - molska masa (g/mol)

A - odziv detektorja (arbitrarna enota)

C - koncentracija (mol/l)

R^2 - korelacijski koeficient (/)

w - vsebnost vlage (%)

SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC

HBA – *angl.* Hydrogen bond acceptors

HBD - *angl.* Hydrogen bond donors

ChCl - Holin klorid

DES - Deep Eutectic Solvents

HPLC - High performance liquid chromatography

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development